

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Doktorský studijní program v biomedicině  
Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



**Mgr. Petra Riegerová**

Využití metody RNA interference (RNAi) ke studiu onkogenních vlastností viru  
Kaposiho sarkomu (KSHV)

Employing an RNA interference method (RNAi) to study oncogenic properties of  
Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)

Disertační práce

Vedoucí disertační práce: Mgr. Barbora Lubyová, Ph.D.

Praha, 2017



**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 31.1.2017

Petra Riegerová

Podpis



**Identifikační záznam:**

RIEGEROVÁ, Petra. *Využití metody RNA interference (RNAi) ke studiu onkogenních vlastností viru Kaposiho sarkomu (KSHV). [Employing an RNA interference method (RNAi) to study oncogenic properties of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)]*. Praha, 2016. Stran 106, přílohy 3. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav imunologie a mikrobiologie. Vedoucí práce Mgr. Barbora Lubyová, Ph.D.



**Poděkování:**

Chtěla bych poděkovat mé školitelce Mgr. Barboře Lubyové, PhD. za poskytnutí zajímavého tématu pro disertační práci, odborné vedení a pomoc během celé doby studia.

Dále děkuji celému týmu pracovníků Ústavu imunologie a mikrobiologie 1.LF za odborné rady, pomoc v laboratoři a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Ráda bych poděkovala i své rodině za jejich podporu a pomoc.





# Obsah

Souhrn .....	11
Abstract .....	13
Abecední seznam zkratk .....	14
1. Teoretická část .....	19
1.1. Úvod.....	19
1.2. Herpesviry .....	19
1.2.1. Životní cyklus herpesvirů.....	20
1.2.2. Klasifikace herpesvirů.....	21
1.3. Virus Kaposiho sarkomu (KSHV) .....	21
1.3.1. Onemocnění související s KSHV .....	23
1.3.2. KSHV kódované latentní geny.....	24
1.3.3. Vliv virem kódovaných interferon regulačních faktorů na patogenezi KSHV .....	27
1.4. Virový interferon regulační faktor 3 (vIRF3) .....	30
1.4.1. vIRF3 a imunitní odpověď .....	30
1.4.2. vIRF-3 a rakovina .....	32
1.4.3. vIRF-3 a apoptóza .....	37
1.5. RNA interference .....	38
2. Stanovené cíle a hypotézy .....	40
3. Materiál a metody .....	43
3.1. Buněčné linie.....	43
3.2. Plazmidy a protilátky .....	43
3.2.1. Izolace plazmidu .....	44
3.3. Reagencie a chemikálie.....	45
3.4. Transfekce .....	45
3.5. RNA interference .....	46
3.6. Imunoprecipitace a Western blot .....	46
3.7. Luciferázová esej .....	47
3.8. GST pull-down.....	48
3.9. Oligonukleotidový pull-down .....	48
3.10. Chromatinová imunoprecipitační (ChIP) esej.....	49
3.11. Reverzní transkripce.....	50
3.12. qPCR (kvantitativní PCR).....	50
3.13. Statistické metody .....	51
4. Výsledky .....	52

4.1. Inhibiční potenciál vIRF3 specifických siRNA .....	52
4.2. vIRF3 a c-Myc .....	53
4.2.1. vIRF3 reguluje stabilitu c-Myc .....	53
4.2.2. Knockdown exprese vIRF3 vede ke snížení proteinové stability c-Myc .....	54
4.2.3. vIRF3 prodlužuje životnost c-Myc proteinu .....	55
4.2.4. Skp2 F-box doména je dostatečná pro interakci s vIRF3.....	56
4.2.5. Aminokyseliny 129-142 a 379-418 na c-Myc jsou důležité pro interakci s vIRF3 ..	58
4.2.6. vIRF3 není schopený inhibovat Skp2/c-Myc interakci ani blokovat ubiquitinaci c-Myc .....	59
4.2.7. vIRF3 spolupracuje s Skp2 při aktivaci c-Myc cílových genů .....	61
4.2.8. c-Myc a Skp2 interagují s vIRF3 (aminokyseliny 346-455).....	62
4.3. vIRF3 a p53.....	65
4.3.1. vIRF3 negativně reguluje proteinovou stabilitu p53 .....	65
4.3.2. vIRF3 snižuje životnost p53.....	66
4.3.3. vIRF3 zesiluje ubiquitinaci p53 .....	67
4.3.4. vIRF3 inhibuje N-koncovou fosforylaci p53 .....	69
4.3.5. vIRF3 interaguje s DNA-vazebnou doménou p53.....	71
4.3.6. Negativní vliv vIRF3 na oligomerizaci p53.....	73
4.3.7. vIRF3 inhibuje asociaci p53 s promotorovou DNA p21 <sup>cip1/waf1</sup> .....	74
4.3.8. vIRF3 inhibuje p53 zprostředkovanou aktivaci transkripce p21 genu.....	77
4.3.9. vIRF3 cílí p53 regulační dráhy u KSHV-pozitivních PEL buněk.....	79
5. Diskuze.....	82
6. Závěr .....	90
7. Seznam použité literatury.....	91
8. Přílohy.....	106

# Souhrn

Virus Kaposiho sarkomu (KSHV) je onkogenní DNA virus, jenž je spojován se všemi epidemiologickými formami Kaposiho sarkomu, primárního efuzního lymfomu (PEL) a s Castlemanovou chorobou (MDC). Stejně jako ostatní herpesviry prochází KSHV dvěma fázemi životního cyklu (latentní a lytická replikace). Během latentní fáze persistuje virový genom ve formě cirkulárního epizómu v jádře infikovaných buněk, kdy se exprimuje pouze několik latentních genů: LANA (latency-associated nuclear antigen), Kaposin, vFLIP (viral FLICE inhibitory protein), vCyklin a vIRF3/LANA2 (viral interferon regulatory factor 3). Tyto geny jsou pak zodpovědné za regulaci proliferace hostitelské buňky, prevenci apoptózy, únik před imunitním systémem a udržení extrachromozomálního virového genomu během dělení.

vIRF3 je multifunkční jaderný protein konstitutivně exprimovaný u KSHV pozitivních PEL buněk a u nádorů Castlemanovy choroby, jehož exprese působí dramatické změny v kritických hostitelských drahách zahrnutých při regulaci apoptózy, buněčného cyklu, protivirové imunitě či onkogenní transformaci.

V naší práci se nám podařilo prokázat a lépe dokumentovat předpokládaný mechanismus, kterým vIRF3 zvyšuje transkripční aktivitu c-Myc a objasnit dříve nedefinovanou roli, již vIRF3 hraje při stimulaci ubiquitinace c-Myc a při regulaci jeho proteinové stability. Při studiu vlivu vIRF3 na stabilitu a funkci p53 jsme pak definovali proces, kterým vIRF3 snižuje životnost proteinu p53 a kterým inhibuje schopnost tohoto tumorsupresoru působit jako účinný regulátor klíčových buněčných drah, jejichž disbalance pak vede k deregulaci buněčného cyklu a apoptózy a přispívá tak ke vzniku KSHV-asociované neoplázie.

Pro stanovení vlivu vIRF3 na patogenezi KSHV jsme využili moderních technik, které nám umožnily studovat danou problematiku *in vitro* i *in vivo* v přirozeném prostředí hostitelské buňky. Doufáme tak, že naše výsledky přispějí k porozumění mechanismu, kterým onkogenní herpesviry ovlivňují klíčové buněčné regulační dráhy a pomůžou v budoucnu poskytnout cíle pro terapii, léčbu či prevenci tumorů asociovaných s KSHV.

**Klíčová slova:** Virus Kaposiho sarkomu (KSHV), Primární efuzní lymfom (PEL), virový interferon regulační faktor 3 (vIRF3), p53, c-Myc, RNA interference



# Abstract

Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) is a DNA tumor virus that has been associated with all epidemiological forms of Kaposi's sarcoma, primary effusion lymphoma (PEL) and multicentric Castleman disease (MCD). Like other herpesviruses, KSHV undergoes two phases of life cycle (latent and lytic replication). During latency, the viral genome persists as a circular episome in the nucleus of the host cell and only a few viral genes are expressed, namely LANA (latency-associated nuclear antigen), Kaposin, vFLIP (viral FLICE inhibitory protein), vCyclin, and vIRF3/LANA2 (viral interferon regulatory factor 3). These viral genes are responsible for regulation of host cell proliferation, prevention of apoptosis, facilitation of immune evasion, and maintenance of the extrachromosomal viral genome during cell divisions.

vIRF3 is a multifunctional nuclear protein that is constitutively expressed in KSHV positive PEL cells and Castleman's disease tumors, which expression causes dramatic changes of critical host pathways that are involved in the regulation of apoptosis, cell cycle, antiviral immunity, and tumorigenesis.

In our study, we have demonstrated and elucidated predicted mechanism, by which vIRF3 enhances transcription activity of c-Myc. Moreover, we have clarified the previously unappreciated role of vIRF3 in the stimulation of c-Myc ubiquitination and protein stability. During the study of influence of vIRF3 on p53 protein stability and function, we have defined mechanism, by which vIRF3 decreases p53 protein half-life and by which vIRF3 down-regulates the ability of this tumor suppressor to act as a potent regulator of key cell pathways. This disbalance results in cell cycle and apoptosis deregulation and thus contributes to development of virus-associated malignancies.

To determine the influence of vIRF3 on KSHV pathogenesis, we used modern techniques, which allowed us the study of present phenomenon in vitro as well as in vivo in natural environment of host cell. We hope, that our results will contribute to better understanding of mechanism, by which tumor viruses affects key regular cell pathways and that they will help to find targets for therapy, treatment or prevention of KSHV associated tumors.

**Keywords:** Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV), Primary effusion lymphoma (PEL), viral interferon regulatory factor 3 (vIRF3), p53, c-Myc, RNA interference

# Abecední seznam zkratk

aa	aminokyseliny
AIDS	„Acquired Immune Deficiency Syndrome“
Akt	protein kináza B
AMK	aminokyselina
APC	antigen prezentující buňky
ARE	„AU-rich element“
ATM	„ataxia telangiectasia-mutated kinase“
Bax	„bcl-2-like protein 4“
BC-3	„pleural effusion B-cell lymphoma“; EBV negativní; wtp53
BCBL-1	„body-cavity-based lymphoma“
BJAB	„human Burkitt lymphoma B cell line“; EBV negativní
BL-21	kompetentní buňky <i>E.coli</i>
bp	„base pair“
BR	„basic region“
C	„cytoplasmatic“
CBF	„centromere binding protein“
CBP	„CREB-binding protein“
CD	„cluster of differentiation“
cdk	cyklin-dependentní kináza
ChIP	chromatinová imunoprecipitační esej
Chk2	„checkpoint kinase 2“
CHX	cykloheximid
CIITA	„class II trans-activator“
CMV	„human cytomegalovirus“
CRD	C-terminální regulační doména
CUL	cullin
DBD	DNA vazebná doména
DED	„death effector domains“
DH5 $\alpha$	kmen <i>E.coli</i>
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNMT	DNA metyltransferáza
DOX	doxorubicin
DR	„direct repeat“
ds	„double stranded“, dvouřetězcová

E1A	„adenovirus early region 1A“
E2F	E2 faktor; rodina transkripčních faktorů, které regulují buněčný cyklus
EBNA3C	„EBV nuclear antigen C3“
EBV	„Epstein-Barr virus“
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	kyselina ethylendiamintetraotová
EGTA	kyselina aminopolykarnoxylová
eIF-2	eukaryotický iniciační faktor 2
ERK	„extracellular signal–regulated kinases“
FBS	„fetal bovine serum“
FL	„full-length“
FOXO	„forkhead box O“
GAPDH	„glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase“
GEF	„guanine nucleotide exchange factor“
GRIM	„genes associated with retinoid-interferon mortality“
GSK	„glycogen synthase kinase“
GST	Glutathion S-transferáza
GTP	guanosintrifosfát
GTPáza	GTP fosfohydroláza
H3	histon 3
HA-tag	„human influenza hemagglutinin“
HAUSP	„herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease“
HBV	„hepatitis B virus“
HCV	„hepatitis C virus“
HCT-116	„human colon cancer cells“
HEK	„human embryonic kidney“
HeLa	„cervical cancer cells taken from Henrietta Lacks“
HEPES	„4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid“
HHV	„human herpes virus“
HIF	„hypoxia-inducible factor“
HIS-tag	histidinová kotva
HIV	„human immunodeficiency virus“
HLH	helix-loop-helix
HPV	„human papillomavirus“
HRP	„horseradish peroxidase“
HSV	„herpes simplex virus“

HTLV-1	„human T-lymphotropic virus“
HVS	„herpesvirus saimiri“
IAD	interferon asociační doména
ICSBP	„Interferon consensus sequence binding protein“
IFN	interferon
I $\kappa$ B	inhibitor $\kappa$ B
IKK	I $\kappa$ B kináza
IP	imunoprecipitace
IPTG	izopropyl $\beta$ -D-thiogalactopyranozid
IRF	interferon regulační protein
ISG	interferonem stimulovaný gen
JSC-1	„primary effusion lymphoma (PEL) cell line“
KDa	kilodalton
KS	Kaposiho sarkom
KSHV	virus Kaposiho sarkomu; „Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus“
LANA	„latency-associated nuclear antigen“
LRR	oblast bohatá na leucin
luc	luciferáza
LZ	leucinový zip
MAP kináza	„mitogen-activated protein kinase“
MBII	Myc box II
MBS	c-Myc vazebné místo
MDC	„multicentric Castleman disease“
Mdm2	„murine double minute 2“
MHC	„major histocompatibility complex“
MK2 kináza	„MAP kinase-activated protein kinase 2“
MM-1	myc modulátor 1
N	„nuclear“
NES	jaderný exportní signál
NF- $\kappa$ B	nukleární faktor kappa B
NICD	„Notch1 intracellular domain“
NK	„natural killer“
NLS	jaderný lokalizační signál
NOXA	„phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1“
N.S.	nespecifický signál
ORF	otevřený čtecí rámec



P	fosfát
PARP	„poly ADP-ribose polymerase“
PBS	„phosphate buffered saline“
PCAF	„p300/CBP-associated factor“
PCR	plymerázová řetězová reakce
PEL	primární efuzní lymfom
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PKR	protein kináza R; dsRNA-aktivovaná protein kináza
PML	„promyelocytic leukemia factor“
POD	„Promyelocytic leukemia oncogenic domains“
PRD	doména bohatá na prolin
PUMA	„p53-upregulated modulator of apoptosis“
qRT-PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
Rb	„retinoblastoma protein“
RISC	„RNA-induced silencing complex“
RLU	relativní množství luciferázy
RNA	ribonukleová kyselina
mRNA	mediátorová RNA
miRNA	„microRNA“
siRNA	„small interfering RNA“
RNAi	RNA interference
RPMI	„Roswell Park Memorial Institute“
RSV	„Rous sarcoma virus“
RTA	„regulator transactivation activator“
RT-PCR	„reverse transcription polymerase chain reaction“
Saos2	„human osteosarcoma cell“; p53 nulitní
SCF	„F-box containing complex“
SDS	dodecysulfát sodný
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti SDS
siN	nesmyslná siRNA
Skp	„S-phase kinase-associated protein“
SUMO	„small ubiquitin-like modifier“
SUV39H1	„Histone-lysine N-methyltransferase“
SV40	„simian virus 40“
TAD	transaktivační doména
TBS	„Tris-buffered saline“

TD	tetramerizační doména
TGF	„transforming growth factor“
TLR	„toll-like receptor“
TNF	„tumor necrosis factor“
TNFR	„tumor necrosis factor receptor“
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetát
U2OS	„human osteosarcoma cell“; wtp53
Ub	ubiquitin
USP	ubiquitin-specifická proteáza
VEGF	„vascular endothelial growth factor“
v-FLIP	„viral fllice-inhibitory protein“
vIL	virový interleukin
vIRF	virový interferon regulační protein
VZV	„Varicella zoster virus“
WB	western blot
wt	„wild-type“
WWP-luc	„The human wild-type p21p reporter and luciferase“

#### Jednopísmenné zkratky nukleotidů

G	guanin
A	adenin
T	thymin
C	cytosin
U	uracil

#### Jednopísmenné a třípísmenné zkratky aminokyselin

A	Ala	alanin		M	Met	methionin
C	Cys	cystein		N	Asn	asparagin
D	Asp	kyselina asparagová		P	Pro	prolin
E	Glu	kyselina glutamová		Q	Gln	glutamin
F	Phe	fenylalanin		R	Arg	arginin
G	Gly	glycin		S	Ser	serin
H	His	histidin		T	Thr	threonin
I	Ile	isoleucin		V	Val	valin
K	Lys	lysin		W	Trp	tryptofan
L	Leu	leucin		Y	Tyr	tyrosin

# 1. Teoretická část

## 1.1. Úvod

Vznik nádorového onemocnění je mnohastupňový proces, při kterém dochází k deregulaci buněčné proliferace a růstu. Jde o různorodou skupinu chorob, nejčastěji postihující tkáň s rychle se množícími buňkami či tkáň stimulované hormony. Nádorové buňky jsou charakterizovány schopností růstu a dělení bez přítomnosti růstových faktorů, neschopností odpovídat na signály pro ukončení růstu a indukci apoptózy, neomezeným počtem buněčných dělení, stimulací angiogeneze a schopností tvorby metastáz. Příčinou vzniku nádorové buňky jsou progresivní genetické abnormality zahrnující mutace tumor supresorových genů, onkogenů, chromozomální abnormality a epigenetické změny, které mohou být způsobeny biologickými, fyzikálními, chemickými či hormonálními vlivy.

Pouze 5-10% incidence nádorových onemocnění je dáváno do spojitosti s genetickými defekty, zatímco zbylých 90-95% nádorů vzniká v souvislosti s životním stylem a prostředím. Přibližně 20% úmrtí spojených s rakovinou je primárně zapříčiněno infekcí (Anand P. *et al.*, 2008), přičemž nejčastějším infekčním agens způsobujícím rakovinu jsou viry. Mezi onkogenní viry patří DNA i RNA viry. DNA viry způsobující rakovinu jsou: HPV (human papillomavirus), polyomavirus (Merkel cell polyomavirus), EBV (Epstein-Barr virus), KSHV (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus), CMV (human cytomegalovirus) a HBV (hepatitis B virus). EBV, KSHV a CMV patří mezi herpesviry. RNA viry spojené se vznikem nádorového bujení jsou: HCV (hepatitis C virus), HTLV-1 (human T-lymphotropic virus) a RSV (Rous sarcoma virus).

## 1.2. Herpesviry

Herpesviry tvoří rodinu obalených DNA virů vyznačující se vysoce organizovanou strukturou virionů s ikosahedrální nukleokapsidou o velikosti 125-130nm. Kapsida je obklopená amorfním proteinovým pláštěm zvaným tegument, jenž je uzavřen v lipidové dvojvrstvě obsahující mnoho kopií více než deseti různých virových glykoproteinů odpovědných za navázání a vstup virionů do hostitelské buňky.

Uvnitř kapsidy je uložena lineární dvouřetězcová DNA o velikosti 125-240kpb s jedním přesahujícím nukleotidem na 3'konci (Mocarski E.S. a Roizman B., 1982; Avrin A. *et al.*, 2007).

V současné době je popsáno 8 lidských a více než 170 zvířecích herpesvirů (Avrin A. *et al.*, 2007). Všechny tyto viry vykazují identický strukturální design popsaný výše, jenž umožňuje viru proniknout do hostitelské buňky a následně se v ní úspěšně replikovat.

### 1.2.1. Životní cyklus herpesvirů

Pro úspěšný vstup virionu do buňky musí nezbytně dojít k fúzi membrán virionu a buňky zajištěné virovými povrchovými glykoproteiny. Po jejich vazbě k buněčnému povrchovému receptoru dochází k vytvoření póru v buněčné membráně a následnému splynutí membrán (Subramanian R. P., a Geraghty R. J., 2007). Jakmile ke splynutí membrán dojde, je virová kapsida spolu s tegumentem, jenž zajišťuje komunikaci s cytoskeletárními proteiny, transportována k jádru infikované buňky (Zaichic S.V. *et al.*, 2013). Již během transportu kapsidy k jádru spouští proteiny tegumentu proces známý jako early shutoff, kdy dochází k utlumení proteosyntézy hostitelské buňky. Kapsida poté injikuje lineární virovou DNA do jádra buňky, kde dochází k cirkularizaci virové DNA a následně k virové transkripci a replikaci podle specifického schématu: 1/nejprve se exprimují bezprostřední rané geny kódující regulační proteiny, jenž zahájí expresi raných genů; 2/následně je pomocí hostitelské polymerázy II transkribována raná virová mRNA, podle níž se v cytoplazmě translatují rané proteiny nezbytné pro replikaci virové DNA, jenž jsou přeneseny zpět do jádra hostitelské buňky, kde je syntetizováno velké množství virové DNA pomocí virové DNA dependentní polymerázy; 3/nakonec jsou pomocí hostitelské polymerázy II exprimovány pozdní proteiny kódující strukturální proteiny, jenž umožní poskládání nových virových kapsid. Během pučení virionu skrz jadernou membránu či endoplazmatické retikulum dojde k navázání tegumentu a membrány. Viriony jsou pak přes Golgiho komplex transportovány k plazmatické membráně, kde dojde k uvolnění zralých virionů, jenž je spojeno se smrtí hostitelské buňky (Avrin A. *et al.*, 2007). Alternativou lytického cyklu je cyklus latentní. Schopnost viru přetrvávat v latentní fázi je však vázána pouze na některé typy buněk.

### 1.2.2. Klasifikace herpesvirů

Na základě biologické charakteristiky a analýzy genomů je řád herpesvirů - *Herpesvirales* - rozdělen do tří rodin: *Herpesviridae* - zahrnující savčí, ptačí a plazi viry; *Alloherpesviridae* - obsahující rybí a žabí viry a *Malacoherpesviridae* napadající měkkýše (Davison A.J. *et al.*, 2008). Rodina *Herpesviridae* je dále rozdělena do tří základních podrodin (*Alfaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* a *Gamaherpesvirinae*).

*Alfaherpesviry* – mají krátký replikační cyklus a široký okruh hostitelů. K latentní infekci dochází v senzoryckých gangliích, produktivně infikovány mohou být různé lidské buňky, nejčastěji membrány sliznice a kůže.

Zástupci lidských alfaherpesvirů jsou Herpes simplex 1 (HSV-1, HHV-1), původce oparů na rtech, Herpes simplex 2 (HSV-2, HHV-2), původce genitálního oparu a Varicella zoster virus (VZV, HHV-3), původce planých neštovic.

*Betaherpesviry* – mají dlouhý replikační cyklus a úzký okruh hostitelů. K infekci dochází u leukocytů. Mezi lidské *Betaherpesviry* patří Cytomegalovirus (CMV, HHV-5), původce cytomegalové mononukleózy, Roselovirus (HHV-6), původce tzv. šesté nemoci a HHV-7, blízkce příbuzný HHV-6.

*Gamaherpesviry* – mají velmi omezený okruh hostitelů a infikují buňky imunitního systému – lymfocyty. Zástupci této podrodiny u lidí jsou Epstein-Barr virus (EBV, HHV-4), původce infekční mononukleózy a Virus Kaposiho sarkomu (KSHV, HHV-8). Oba druhy mohou vyvolat lymfoproliferativní onemocnění a nádorové bujení.

### 1.3. Virus Kaposiho sarkomu (KSHV)

Kaposiho sarkom byl poprvé popsán v roce 1872 Moritzem Kaposim jako idiopatický pigmentovaný sarkom kůže. Souvislost přítomnosti herpesviru s Kaposiho sarkomem pak byla prokázána až v roce 1994 Yuan Changovou a kol., když izolovali DNA fragmenty herpesviru z Kaposiho sarkomu pacienta s AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) (Chang Y. *et al.*, 1994) Následný výzkum pak potvrdil KSHV jako etiologický původce Kaposiho sarkomu a fylogeneticky jej zařadil k lymfotropním herpesvirům (Cohen A. *et al.*, 2005). Toto zařazení dále usnadnilo identifikovat KSHV jako etiologický agens dalších dvou lymfoproliferativních onemocnění: primárního

efuzního lymfomu (PEL) a Castlemanovy choroby (MDC, multicentric Castleman disease) (Cesarman E. *et al.*, 1995; Soulier J. *et al.*, 1995; Wen K.W. a Damania B., 2010). Symptomy související s primární infekcí KSHV jsou u imunokompetitivního jedince velmi mírné, téměř neznatelné. Incidence onemocnění asociovaných s KSHV je zvýšená imunosupresí u příjemců transplantovaných orgánů či u pacientů s AIDS (Hayward G.S., 1999; Andreoni M., 2002).

Séroprevalence KSHV v lidské populaci silně variuje. Vysoká incidence KSHV je zaznamenána v Africe, severním středomoří či v zemích východní Evropy, kde u dospělé populace kolísá mezi 20 a 80%. Naopak v USA, Asii a severní Evropě je séroprevalence KSHV pod 10% (Minhas V. a Wood C., 2014).

Genomem KSHV je lineární dvouřetězcová DNA o velikosti 165kpb (Russo R. *et al.*, 1996), kódující nejméně 87 otevřených čtecích rámců (ORF) tvořících 140kpb velkou centrální oblast, obklopenou rozsáhlou, 801pb dlouhou, nekódující GC-bohatou (85%) koncovou repeticí (Lagunoff M. a Ganem D., 1997). Některé z genů KSHV vykazují blízkou homologii s buněčnými geny, jenž regulují buněčný růst, imunitní a zánětlivou odpověď či apoptózu (Boshoff C. *et al.*, 1997; Molden J. *et al.*, 1997; Thome M. *et al.*, 1997; Bais C. *et al.*, 1998; Moore P.S. a Chang Y., 1998; Lubyova B. a Pitha P.M., 2000).

Během latentní infekce je virová DNA uchovávána v podobě cirkulárního epizómu, jenž asociuje s buněčnými históny a perzistuje jako neintegrovaný minichromozóm v jádře infikovaných buněk (Toth Z. *et al.*, 2013). Každá z latentně infikovaných buněk obsahuje 50-100 kopií KSHV. V této fázi dochází k expresi pouze několika latentních genů, odpovědných za proliferaci hostitelské buňky, prevenci apoptózy a udržení extrachromozomálního virového genomu během dělení (Dittmer D. *et al.*, 1998; Sarid R. *et al.*, 1998; Talbot S.J., 1999; Fakhari F.D. a Dittmer D.P., 2002; Lu M. *et al.*, 2004; Chandriani S. a Ganem D., 2010). Latentní replikace je řízená z replikačního počátku – episomu, umístěného na koncové repetici (Ballestas M. a Kaye K., 2001). Latence PEL buněk je relativně stabilní – pouze u 1–3% buněk dochází k spontánní lytické reaktivaci (Myoung J. a Ganem D., 2011). Exogenní signály mohou frekvenci reaktivity zvýšit aktivací virem kódovaného regulačního proteinu RTA (Regulator Transactivation Activator) (Wang S.E. *et al.*, 2003). Pokud dojde k reaktivaci viru, a tedy k lytické replikaci, je virový genom *gamaherpesviru* uvolněn z jeho kompaktní chromatinové struktury a následně replikován jako souvislá lineární molekula (rolling cycle model). Takto vznikající virová DNA je přestřižená uvnitř

terminální repetice a balená do nově vznikajícího virionu. Viriony jsou pak transportovány k plazmatické membráně a uvolněny z buňky. Po infekci nové buňky je lineární DNA obsažená ve virionu injikována do jádra. K cirkularizaci virové DNA dochází zatím ne úplně popsáním procesem, jenž v sobě zřejmě zahrnuje homologní rekombinaci (Nixon D.E. a McVoy M.A., 2002).

### 1.3.1. Onemocnění související s KSHV

Virus Kaposiho sarkomu je dáván do souvislosti se všemi klinickými formami Kaposiho sarkomu (Chang Y. *et al.*, 1994), primárním efuzním lymfomem (Cesarman E. *et al.*, 1995) a Castlemanovou chorobou (Soulier J. *et al.*, 1995). Jde o vzácná neoplastická onemocnění, jež jsou asociována s imunodeficientním stavem u jedinců infikovaných virem Kaposiho sarkomu.

Kaposiho sarkom (KS) je nádorové onemocnění endotelu, postiženy tedy bývají výstelky krevních cév a kapilár (Wang H.W. *et al.*, 2004). Kaposiho sarkom se může objevit na kůži, v ústní dutině, v nose, lymfatických uzlinách i na jiných sliznicích, či na plicích a v ostatních vnitřních orgánech. Nádor se jeví jako zarudlá nebo až nafialovělá skvrna, která se plošně šíří, přičemž dochází k masivní neoangiogenezi (Kaplan L.D., 2013). Někdy se objevují i otoky, ložiska se mohou rozpadat. Většinou je nebolestivý, kožní sarkomy jsou víceméně neškodné. U viscerální formy, jenž se vyskytuje převážně v souvislosti s AIDS, je riziko smrtelného krvácení.

Primární efuzní lymfom (PEL) je charakterizován jako agresivní lymfom vyskytující se převážně u pacientů s AIDS, prezentující se jako maligní výron v peritoneální, pleurální či v perikardiální oblasti, často bez zjevné přítomnosti nádorové masy (Carbone A. a Gaidano G., 1997). Nádorové buňky jsou monoklonální a pocházejí z B-buněčné linie.

Castlemanova choroba (MDC) je nejčastěji nacházena u HIV pacientů a u příjemců transplantovaných orgánů. Jde o lokalizované lymfoproliferativní onemocnění histologicky charakterizované expandovanými zárodečnými centry s proliferujícími cévními a B-buňkami (Corbellino L. *et al.*, 1996).

### 1.3.2. KSHV kódované latentní geny

Zkoumání latentní infekce v B-buňkách odvozených z PEL vedlo k identifikaci hlavního latentního lokusu, jenž je transkribován ve všech latentně infikovaných buňkách. Tento region zahrnuje 4 ORF kódující LANA (latency-associated nuclear antigen), v-cyklin, v-FLIP (flice-inhibitory protein), a Kaposin. Exprese tohoto lokusu je řízená ze dvou promotorů – LANA promotor, jenž produkuje množství sestřižených mRNA kódujících LANA, v-cyklin a v-FLIP proteiny a – Kaposinový promotor, generující Kaposiny a sérii miRNA (Dittmer D. *et al.*, 1998; Umbach J.L. a Cullen B.R., 2009).

Druhý latentní lokus exprimovaný v latentních PEL buňkách kóduje vIRF3 protein (viral interferon regulatory factor 3) (Rivas C. *et al.*, 2001).

Některé studie uvádějí expresi dalších dvou latentních proteinů. Jde o signální molekuly, k jejichž expresi dochází u latentně infikovaných buněk pouze ve velmi malém množství, či v určitém specifickém kontextu. Prvním z nich je K1 protein, konstitutivní signální molekula, jenž imituje signalizaci přes B-buněčný antigenní receptor. Druhým je vIL-6 (virový interleukin 6), jenž slouží jako B-buněčný růstový faktor a přispívá tak k přežití infikované buňky (Lee B.S. *et al.*, 2005; Chandriani S. a Ganem D., 2010).

LANA (latency-associated nuclear antigen, ORF73) je dlouhý polypeptid, jenž hraje kritickou roli v persistenci a segregaci latentního virového genomu (Sun Q. *et al.*, 2014; Sun Z. *et al.*, 2015; Li S. *et al.*, 2015). Jeho unikátní C-koncová doména obsahuje sekvenčně specifickou vazebnou oblast, jenž rozpoznává konzervativní sekvenci přítomnou na koncové repetici virové DNA, a která je replikačním počátkem latentního virového plazmidu – oriP (Ballestas M. *et al.*, 1999; Cotter M.A. a Robertson E.S., 1999; Barbera A.J. *et al.*, 2006).

Kromě udržování virového genomu v latentní fázi, hraje LANA významnou roli i ve virové patogenezi. Prokázána byla jeho asociace s tumorsupresory p53 a Rb (retinoblastoma protein) (Friborg J. Jr. *et al.*, 1999; Radkov S.A. *et al.*, 2000). Dalším interakčním partnerem LANA je kináza GSK-3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3), která cílí transkripční regulátor  $\beta$ -catenin a c-Myc protoonkogen k proteazomální degradaci (Fujimuro M. a Hayward, S.D., 2003). Mimoto působí LANA jako transkripční ko-aktivátor glukokortikoidového receptoru (Togi S. *et al.*, 2015), blokuje expresi MHC-II



(major histocompatibility complex class II) genů (Cai Q. *et al.*, 2013; Thakker S. *et al.*, 2015) a přímo asociuje s c-Myc (Liu J. *et al.*, 2007), DNA metytransferázou DNMT3a (Shamay M. *et al.*, 2006), histon-metyltransferázou SUV39H1 (Sakakibara S. *et al.*, 2004), či s angiogeninem – regulátorem angiogeneze (Paudel N. *et al.*, 2012).

LANA je tedy nejen významným latentním regulátorem KSHV, má také významný vliv na modulaci imunitní odpovědi, regulaci buněčného cyklu (Paudel N. *et al.*, 2012) či apoptózy hostitelské buňky.

vFLIP (ORF K13) je malý polypeptid tvořený dvěma tandemovými DED doménami (death effector domains). Tento protein se váže ke  $\gamma$  podjednotce I $\kappa$ B kinázy (IKK), čímž účinně aktivuje NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor  $\kappa$ B) (Field N. *et al.*, 2003; Bagnéris C. *et al.*, 2015). Vzhledem k tomu, že NF- $\kappa$ B působí jako supresor lytické reaktivity u latentně infikovaných PEL buněk (Brown H.J. *et al.*, 2003), je vFLIP významným regulátorem latence KSHV a přispívá k přežití infikovaných buněk.

v-cyklin (ORF72) je virový homolog buněčného cyklinu D (Chang Y. *et al.*, 1996). Stejně jako jeho buněčný homolog aktivuje v-cyklin kinázový komplex s cdk6 (cyclin dependent kinase 6), jenž je následně rezistentní vůči jeho inhibitorům. Absence vazby inhibitorů na cyklin/CDK komplex předchází blokaci v G1 fázi a vede tedy k progresi buněčného cyklu (Swanton C. *et al.*, 1997; Jones T. *et al.*, 2014). Virové cykliny tak významně participují na onkogenním charakteru těchto virů.

Latentní kaposinový promotor generuje proteiny kaposinové rodiny a také množství virových miRNA.

mRNA kaposinů obsahuje dva sety 23 nukletidů dlouhé GC-bohaté repetitivní sekvence (DR1 a DR2 – direct repeat), následované krátkým otevřeným čtecím rámcem ORF K12, jenž kóduje transmembránový protein Kaposin A. Alternativní translační iniciace zahrnující DR sekvence vede k tvorbě Kaposinu B (Sadler R. *et al.*, 1999).

Kaposin A je malý hydrofóbní polypeptid nacházející se v intracelulárních i povrchových buněčných membránách, jehož overexprese vede k buněčné transformaci v imortalizovaných buněčných kulturách (Muralidhar S. *et al.*, 2000). Mechanismus funkce Kaposinu A není doposud zcela objasněn, nicméně současná data prokázala jeho vazbu k GEF (Guanine Nucleotide Exchange Factor) proteinu cytohesinu-1, jenž aktivuje membránově asociované GTPázy (Kliche S. *et al.*, 2001). Krom toho, Kaposin

A inhibuje septin-4, jenž je GTP-vazebným proapoptotickým proteinem (Lin C.W. *et al.*, 2007).

Kaposin B je malý protein interagující s MK2 kinázou (MAP kinase-associated protein kinase 2). Vazba Kaposinu B na MK2 vede k aktivaci kinázy a následně ke stabilizaci mRNA obsahujících AU-bohaté elementy (ARE) jenž je charakteristická pro mnoho cytokinů (McCormick C. a Ganem D., 2006).

Micro-RNA (miRNA) jsou 19-23 nukleotidů dlouhé nekódující RNA regulující expresi mRNA jejich štěpením či inhibicí translace. U KSHV bylo prozatím identifikováno 12 miRNA (miR-K12-1 až miR-K12-12), jenž jsou exprimovány během latence, i když mnohé z nich mohou být detekovány i během infekce lytické (Samols M.A. *et al.*, 2005; Cai X. *et al.*, 2005; Umbach J.L. a Cullen B.R., 2009). Studie zaměřené na cílové transkripty KSHV miRNA uvnitř hostitelské buňky prokázaly jejich vliv na modulaci cytokinové produkce (Abend J.R. *et al.*, 2010; Quinn S.R. a O'Neill L.A., 2014), či na NF- $\kappa$ B signalizaci (Lei X. *et al.*, 2010). Krom toho interferují s TGF $\beta$  (transforming growth factor beta) signalizací (Liu Y. *et al.*, 2012), omezují rozpoznávání infikovaných buněk NK (natural killer) buňkami (Nachmani D. *et al.*, 2009), podporují migraci a invazi endoteliálních buněk (Hu M. *et al.*, 2015), stimulují angiogenezi (Ramalingam D. *et al.*, 2015) a modifikují progresi buněčného cyklu (Gottwein E. a Cullen B.R., 2010). KSHV miRNA navíc nepřímo tlumí expresi RTA a přispívají tak k udržení latentní fáze virové infekce (Plaisance-Bonstaff K. *et al.*, 2014; Bellare P. a Ganem D., 2009).

vIRF3 je exprimován jako *bona fide* latentní produkt v PEL buňkách a nádorech spojovaných s Castlemanovou chorobou, díky čemuž je někdy nazýván také jako LANA2 (latency-associated nuclear antigen 2) (Cunningham C. *et al.*, 2003; Jenner R.G. *et al.*, 2001; Rivas C. *et al.*, 2001; Fakhari F.D. a Dittmer D.P., 2002).

Expres vIRF3, jenž je nezbytná pro proliferaci PEL buněk (Wies E. *et al.*, 2008), působí dramatické změny v kritických hostitelských drahách zahrnutých v regulaci apoptózy, buněčného cyklu, protivirové imunity a ve vývoji nádorů. Povaha vIRF3 proteinu je lépe vnímána v kontextu protivirové odpovědi hostitelské buňky a ostatních virem kódovaných interferon regulačních faktorů, proto je této otázce věnována následující kapitola.

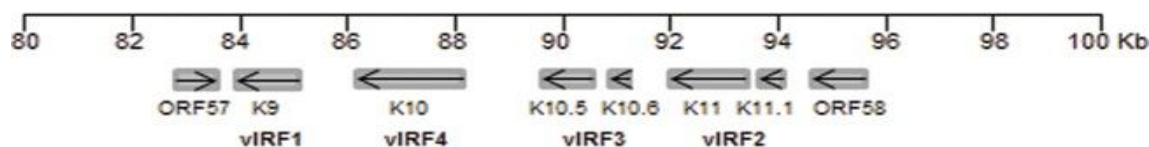
### 1.3.3. Vliv virem kódovaných interferon regulačních faktorů na patogenezi KSHV

Zásadním krokem pro úspěšnou infekci KSHV je překonání imunitní protivirové odpovědi hostitelské buňky. V časně fázi virové infekce dochází k produkci buněčných interferon regulačních faktorů (IRF), které hrají kritickou roli v aktivaci interferonu typu I (IFN) a také v indukci chemokinů, prozánětlivých cytokinů či v přímé protivirové a protibakteriální odpovědi (Takeuchi O. *et al.*, 2004; Paun A. a Pitha P.M., 2007; Tamura T. *et al.*, 2008).

Všechny buněčné IRF vykazují homologickou sekvenci pěti tryptofanů v N-koncové části polypeptidu, jenž tvoří DNA-vazebnou doménu (DNA-binding domain - DBD). Naopak C-koncová část těchto proteinů je variabilní, přičemž může obsahovat IRF-asociační doménu (IAD), ulehčující formování homo – a heterodimerů a interakci s dalšími transkripčními faktory, díky čemuž mohou IRF fungovat jako transkripční aktivátory či represory. Tři z buněčných interferonů (IRF-3, -5 a -7) plní důležitou roli v protivirové odpovědi (Paun A. a Pitha P.M., 2007; Tamura T. *et al.*, 2008). IRF-3 působí jako prostředník virem-zprostředkované signalizace a spolu s IRF-7 kontrolují transkripční aktivaci alfa/beta IFN genů (IFN- $\alpha/\beta$ ) (Au W.C. *et al.*, 1995; Au W.C. *et al.*, 2001; Zhang L. a Pagano J.S., 2002; Solis M. *et al.*, 2006). Všechny popsané IRF dále obsahují jaderný lokalizační signál, který umožňuje jejich přenesení do jádra. Během homeostáze však některé IRF zůstávají v cytoplazmě buňky a přesouvají se do jádra až v rámci odpovědi na virovou infekci. Vzhledem k tomu, že se IRF uplatňují i v dalších regulačních procesech buňky, jako je modulace buněčného růstu, diferenciace či apoptóza, může deregulace jejich funkce vést ke vzniku nádorů (Harada H. *et al.*, 1993; Takaoka A. *et al.*, 2008; Tamura T. *et al.*, 2008; Savitsky D. *et al.*, 2010). Imitace buněčných IRF virovými homology (vIRF) je tedy velmi výhodnou virovou strategií, která mu pomáhá uniknout hostitelskému imunitnímu systému. Přítomnost KSHV kódovaných homologů IRF (vIRF) však může nejen efektivně tlumit interferonovou signalizaci, ale i modulovat buněčné protinádorové mechanismy a přispívat tak k celkové patogenezi asociované s virem Kaposiho sarkomu.

KSHV kóduje 4 vIRF (vIRF1 – vIRF4) jako klastr otevřených čtecích rámců (ORF K9, K11/11.1, K10.5/10.6 a K10), jenž jsou vloženy mezi ORF57 a ORF58, avšak s opačnou orientací transkripce (Offermann M.K., 2007) (Obr. 1). vIRF vykazují určitou homologii s buněčnými IRF (Russo J.J. *et al.*, 1996), nicméně neobsahují

sekvenci tryptofanů v DNA-vazebné doméně a nejsou schopné vázat se do oblasti promotorů IFN I či ISG (interferon-stimulated gene) genů.



Obr. 1.: Uspořádání genů vIRF lokusu v genomu KSHV. Otevřené čtecí rámce kódující vIRF jsou umístěny mezi ORF 57 a ORF 58 (83–95 kpb).

vIRF1 (ORF K9) je 449 aminokyselin dlouhý lytický gen (Zimring J.C. *et al.*, 1998; Burýsek L. *et al.*, 1999), přičemž jeho nízké hladiny byly detekovány v latentně infikovaných buňkách KS a PEL. vIRF1 vykazuje nejvyšší stupeň homologie s buněčnými IRF s tím, že jeho DNA-vazebná doména obsahuje pouze dva z pěti tryptofanů (Russo J.J. *et al.*, 1996).

vIRF1 potlačuje expresi interferonem aktivovaných genů a blokuje IRF-1 a IRF-3 zprostředkovanou transkripci (Gao S.J. *et al.*, 1997; Li M. *et al.*, 1998; Zimring J.C. *et al.*, 1998; Burýsek L. *et al.*, 1999; Lin R. *et al.*, 2001; Hew K. *et al.*, 2013; Jacobs S.R. *et al.*, 2015). Dalším virovým mechanismem zajišťujícím výhodu nad imunitním systémem hostitelského organismu je utlumení syntézy bazální i IFN-zprostředkované transkripce MHC-I (major histocompatibility complex class I) přes interakci vIRF1 s transkripčním aktivátorem p300 (Lagos D. *et al.*, 2007).

Kromě regulace buněčné antivirové odpovědi, přispívá vIRF1 ke vzniku rakoviny či k modulaci apoptotické signalizace. Asociace vIRF1 s ATM (ataxia telangiectasia-mutated) kinázou vede k blokaci její kinázové aktivity indukované poškozením DNA. Následkem je defosforylace a následná ubiquitinace a degradace klíčového tumor supresoru p53 (Nakamura H. *et al.*, 2001; Shin Y.C. *et al.*, 2006). vIRF1 také přímo interaguje s DNA-vazebnou doménou p53 a inhibuje tak jeho aktivitu (Seo T. *et al.*, 2001). Asociace vIRF1 s USP7 (ubiquitin-specific protease 7), proteinem regulujícím stabilitu p53, navíc vede k inhibici protivirové odpovědi vázané na p53 (Kim Y. *et al.*, 2016). Onkogenní potenciál vIRF1 je podpořen jeho schopností utlumit TGF- $\beta$ /Smad (transforming growth factor  $\beta$ /Smad) signální dráhu (Seo T., *et al.*, 2005), která reguluje mnoho biologických procesů zahrnutých v regulaci buněčného růstu, diferenciace, produkce matrix či apoptózy (Moustakas A. *et al.*, 2002).

vIRF1 dále inhibuje mitochondriální protivirovou signalizaci (Hwang K.Y. a Choi Y.B., 2015) a interaguje s proapoptotickými proteiny Bim a Bid, což vede k inhibici buněčných proapoptotických signálů (Choi Y.B. a Nicholas J., 2010; Choi Y.B. *et al.*, 2012). V přítomnosti vIRF1 také dochází k blokaci indukce apoptózy zajišťované GRIM19 (Seo T. *et al.*, 2002) a k inhibici exprese CD95 ligandu, jenž je induktorem apoptózy přes CD95 receptor (Kirchhoff S. *et al.*, 2002).

vIRF2 (ORF K11 a K11.1) je 680 aminokyselin velký protein, který je přepisován jako sestřižený transkript skládající se ze 2 exonů. vIRF2 je přítomen v cytoplasmě a v jádře infikovaných buněk. Jeho exprese může být indukována IFN (Jenner R.G. *et al.*, 2001; Fakhari F.D. a Dittmer D.P., 2002; Aresté C. *et al.*, 2009).

vIRF2 inhibuje komponenty časných i pozdních protivirových signálních drah (Fuld S. *et al.*, 2006; Aresté C. *et al.*, 2009; Mutocheluh M. *et al.*, 2011). Tento protein, působící jako transkripční faktor, má DNA-vazebný potenciál k promotorové oblasti nejméně 100 buněčných genů (Hu H. *et al.*, 2015). vIRF 2 působí jako aktivátor PI3K/Akt dráhy (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B) (Kim Y. *et al.*, 2016). Asociace vIRF2 s PKR (dsRNA-activated protein kinase) vede k inhibici jeho kinázové aktivity a následnému utlumení syntézy proteinů zahrnutých v regulaci buněčného růstu, diferenciace, protivirové ochrany či indukci apoptózy (Burýsek L. a Pitha P.M., 2001). Mimoto vIRF2, stejně jako vIRF1, inhibuje expresi CD95L (Kirchhoff S. *et al.*, 2002).

vIRF3 (ORF K10.5 a K10.6) je sestřižený produkt dvou ORF (Lubyová B. a Pitha P.M., 2000). Tento 566 aminokyselin dlouhý protein je konstitutivně exprimován v jádře hematopoetických tkání infikovaných KSHV zahrnujících PEL a Castlemanovu chorobu, nicméně chybí u tkání Kaposiho sarkomu (Rivas C. *et al.*, 2001). Na rozdíl od ostatních vIRF, není vIRF3 indukován během lytické reaktivace způsobené TPA (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate) u PEL buněk (Wies E. *et al.*, 2008). vIRF3 vykazuje signifikantní homologii s IRF-asociační doménou (IAD) buněčného IRF-8/ICSBP (Lubyová B. a Pitha P.M., 2000; Rivas C. *et al.*, 2001; Lubyová B. *et al.*, 2004). IAD je ustálená oblast sdílená všemi IRF mimo IRF-1 a IRF-2 zajišťující homo- a heterodimerické interakce mezi jednotlivými IRF či mezi IRF a dalšími buněčnými faktory (Ozato K. *et al.*, 2007).

Vliv vIRF3 na buněčné procesy bude podrobněji popsán v kapitole 1.4.

vIRF4 (ORF K10) je s 911 aminokyselinami největší z KSHV kódovaných vIRF, jenž hraje významnou roli v reaktivaci KSHV (Xi X. *et al.*, 2012). vIRF4 cílí  $\beta$ -catenin/CBP (CREB-binding protein) a blokuje jeho vazbu k promotoru cyklínu D1. Následkem je utlumení progresu G1-S fáze buněčného cyklu a zvýšení replikace KSHV (Lee H.R. *et al.*, 2015).

Tento lytický protein interaguje s Mdm2 (murine double minute 2) E3 ubiquitin ligázou, což vede k redukci p53 skrze proteazómem zprostředkovanou degradaci (Lee H.R. *et al.*, 2009). Stabilita p53 a Mdm2 je dále ovlivněna vazbou vIRF4 k HAUSP (herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease) (Lee H.R. *et al.*, 2011). vIRF4 dále silně potlačuje expresi IRF4 a c-Myc, čímž pozměňuje profil genové exprese hostitelské buňky a usnadňuje tak lytickou replikaci viru (Lee H.R. *et al.*, 2014).

Krom toho se vIRF4 váže k CBF1 a brání tak jeho vazbě k NICD – intracelulárnímu fragmentu Notch, čímž úspěšně dereguluje signální transdukční dráhu receptoru Notch regulující mnoho buněčných vývojových procesů (Kopan R. a Ilagan M.X.G., 2009; Heinzelmann K. *et al.*, 2010).

## 1.4. Virový interferon regulační faktor 3 (vIRF3)

### 1.4.1. vIRF3 a imunitní odpověď

Modulace imunitní odpovědi infikované buňky pomocí vIRF3 dává KSHV výhodu, jež je nezbytná pro úspěšné navození latentní virové infekce. Vliv vIRF3 na deregulaci nespecifické protivirové odpovědi však není omezen pouze na jeho interakci s buněčnými IRF. Podstatnou roli hraje taktéž jeho asociace s transkripčním faktorem NF- $\kappa$ B, či jeho vliv na schopnost antigenní prezentace infikovaných buněk.

#### vIRF3 a buněčné IRF

Podobně jako vIRF1 a vIRF2, dokáže vIRF3 modulovat nespecifickou protivirovou odpověď hostitelské buňky. Prokázána byla jeho asociace s aktivovanými jadernými IRF-3 a IRF-7 (Joo C.H. *et al.*, 2007), stejně tak jako jeho interakce s IRF-5 (Wies E. *et al.*, 2009; Bi X. *et al.*, 2011). Mapování vIRF3-vazebné domény prokázalo vazbu vIRF3 k IRF-3 a IRF-7 skrz jeho C-koncovou oblast (aminokyseliny 254-566).

Přestože vIRF3 není DNA-vazebný protein, jeho interakce s IRF-3, IRF-7 a p300 vede k jeho asociaci a promotorovou oblastí IFN- $\alpha$  genů, přičemž přítomnost vIRF3 zvyšuje vazebnou afinitu IRF-3, IRF-7 a acetylovaného histonu H3 do této promotorové oblasti (Lubyová B. *et al.*, 2004). V kontrastu s těmito tvrzeními Joo a kol. ukázali, že vIRF3 naopak blokuje IRF-7 zprostředkovanou nespecifickou imunitní odpověď interakcí s DNA-vazebnou doménou či IRF-asociační doménou IRF-7, čímž brání vazbě IRF-7 k DNA a následně inhibuje expresi IFN- $\alpha$  genů (Joo C.H. *et al.*, 2007).

IRF-5 je transkripční faktor hrající klíčovou roli v indukci protivirové, prozánětlivé a autoimunitní odpovědi (Takaoka A. *et al.*, 2005; Paun A. *et al.*, 2008). Přestože je IRF-5 cílovým proteinem pro p53, je jeho funkce v regulaci buněčného cyklu a apoptózy na p53 nezávislá (Barnes B.J. *et al.*, 2003). IRF-5 je exprimován v B-buňkách, v dendritických buňkách a makrofágách, kde zůstává v cytoplasmě jako inaktivní protein. Při indukci signálů poškození DNA či během aktivace IFN, TLR7 (toll-like receptor) či TLR9 drah, je IRF-5 fosforylován a K63 ubiquitinován a následně translokován do jádra. Naproti tomu u PEL buněk je IRF-5 přítomen v jádře konstitutivně. Interakce IRF-5 a vIRF3 vede k inhibici vazby IRF-5 k promotoru IFN- $\beta$  a ISG (interferon-responsive gene) (Wies E. *et al.*, 2009). Krom toho, vIRF-3 brání IRF-5 zprostředkované aktivaci promotoru p21 a předchází tak IRF-5 vyvolané G<sub>2</sub>/M blokaci buněčného cyklu (Wies E. *et al.*, 2009; Bi X. *et al.*, 2011).

#### vIRF3 a NF- $\kappa$ B

Aktivace NF- $\kappa$ B je částí imunitní odpovědi, jež také může být indukována virovou infekcí. NF- $\kappa$ B je transkripční faktor regulující produkci cytokinů, receptorů nezbytných pro imunitní rozpoznávání a proteinů účastnících se antigenní prezentace (Silverman N. a Maniatis T., 2001; Karin M. a Lin A., 2002). U nestimulovaných buněk je NF- $\kappa$ B lokalizován v cytoplasmě v neaktivní formě, kde je navázán na inhibiční protein I $\kappa$ B. Během virové infekce je I $\kappa$ B fosforylován a následně ubiquitinován, což vede k jeho degradaci. Za fosforylaci I $\kappa$ B je odpovědný I $\kappa$ B kinázový (IKK) komplex skládající se ze tří podjednotek: IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  a IKK $\gamma$ . Uvolněný NF- $\kappa$ B je pak translokován do jádra, kde aktivuje transkripci cílových genů (Ghosh S. a Karin M., 2002). Fosforylace I $\kappa$ B je tedy klíčovým krokem v regulaci aktivace NF- $\kappa$ B.

Asociace vIRF3 s IKK $\beta$  byla prokázána u transfekovaných HEK293T buněk. Přímá interakce vIRF3 s  $\beta$  podjednotkou IKK vede ke snížení fosforylace I $\kappa$ B a tím i k neschopnosti NF- $\kappa$ B přesunout se do jádra. Důsledkem potlačení aktivity NF- $\kappa$ B je

mimo jiné zvýšení TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ) -indukované apoptózy. V přítomnosti vIRF3 pak dochází k signifikatnímu nárůstu apoptózy indukované TNF $\alpha$  (Seo T. *et al.*, 2004).

#### vIRF3 a MHC-II

Únik antigenní prezentaci hostitelské buňky je efektivní strategie KSHV, při níž vIRF3 hraje důležitou roli. vIRF3 narušuje odpověď adaptivního imunitního systému inhibicí exprese MHC-II (major histocompatibility complex class II) a IFN- $\gamma$ . Molekuly MHC-II jsou přítomny na povrchu několika specializovaných typů buněk jako jsou makrofágy, dendritické buňky a B buňky, které jsou profesionálními antigen-prezentujícími buňkami (APC). U lidí je pak exprese MHC-II vyvolatelná IFN- $\gamma$  u většiny typů buněk (Reith W. *et al.*, 2005).

U KSHV pozitivních PEL buněk je exprese MHC-II snížena ve srovnání s KSHV-negativními B buněčnými lymfómy. Knockdown vIRF3 navozený pomocí siRNA (small interfering RNA) u KSHV infikovaných PEL buněčných linií, zvýšil hladinu MHC-II (Schmidt K. *et al.*, 2011), zatímco nadprodukce tohoto virového proteinu u KSHV-negativních buněk (BJAB) vedla ke snížení množství MHC-II. Tato suprese MHC-II je zapříčiněná vIRF3 zprostředkovanou inhibicí CIITA (class II trans-activator), jenž je hlavním regulátorem transkripce MHC-II. Exprese CIITA je pod kontrolou PIII promotoru, jenž je specifický pro B buňky, nebo PIV promotoru, jenž je indukovatelný IFN- $\gamma$ . Přítomnost vIRF3 v PEL buňkách snižuje aktivitu PIII i PIV promotoru. Stejně tak vIRF-3 snižuje aktivitu promotoru IFN- $\gamma$ . Knockdown vIRF-3 v PEL buňkách naopak způsobí zvýšení hladiny IFN- $\gamma$  proteinu (Schmidt K. *et al.*, 2011). Suprese IFN- $\gamma$  signalizace tak vede k utlumení exprese MHC-II a přispívá tak k efektivnímu úniku antigenní prezentace u buněk infikovaných KSHV (Zuo J. *et al.*, 2013).

#### 1.4.2. vIRF-3 a rakovina

Vznik rakoviny je podmíněn procesem, který zahrnuje řadu událostí vedoucích k progresi cytologických, genetických či buněčných změn. Nahromadění těchto změn pak způsobí nekontrolované buněčné dělení a růst nádoru. Častou příčinou onkogeneze je inaktivace tumor supresorového genu či aktivace buněčných protoonkogenů. V případě



onkogeneze způsobené viry hraje podstatnou roli také zeslabení protivirové odpovědi. vIRF3 kódovaný virem Kaposiho sarkomu může přispět k vývoji nádoru nejméně dvěma mechanismy: 1) aktivací protoonkogenu c-Myc (Lubyová B. *et al.*, 2007) a 2) asociací s klíčovým tumor supresorem p53 (Rivas C. *et al.*, 2001). vIRF3 je dále zahrnut v regulaci apoptózy, buněčného cyklu a v modulaci dynamiky mikrotubulů (Munoz-Fontela C. *et al.*, 2008).

#### vIRF3 a c-Myc

c-myc je velmi dobře charakterizovaný protoonkogen. Je to účinný transkripční faktor aktivující expresi mnoha transkripčně aktivních buněčných genů (Lin C.Y. *et al.*, 2012), včetně genů zahrnutých v regulaci a kontrole buněčného cyklu, proliferace a přežití (Grandori C. *et al.*, 2000). Konstitutivní exprese c-myc snižuje potřebu růstových faktorů, brání blokaci růstu a tlumí buněčnou diferenciaci (Alexandrow M. *et al.*, 1995; Hermeking H. *et al.*, 1995). c-Myc je protein s velmi krátkou životností (half-life ~ 30min) a jeho rychlá degradace je zásadní pro správné fungování buněčného růstu (Hann S.R. a Eisenman R.N., 1984). Významným regulátorem proteinové stability c-Myc je ubiquitin ligáza Skp2 (S-phase kinase-associated protein 2) (Jin J. a Harper J., 2003; Kim S.Y. *et al.*, 2003; von der Lehr N. *et al.*, 2003; von der Lehr N. *et al.*, 2003b). skp2 kóduje F-box protein ubiquitin ligázového komplexu SCF<sup>skp2</sup>, tvořeného Skp2, Cul1 a Skp1 proteiny, jenž zajišťuje ubiquitinaci a proteazomální degradaci c-Myc (Frescas D., a Pagano M., 2008). Skp2 ubiquitin ligáza je navíc potřebná pro indukci genů regulovaných c-Myc, což přispívá k názoru, že ubiquitinace c-Myc přispívá nejen k jeho rychlé degradaci, ale také ke stimulaci jeho transkripční aktivity (Jin J. a Harper J.W., 2003; Kim S.Y. *et al.*, 2003; von der Lehr N. *et al.*, 2003; von der Lehr N. *et al.*, 2003b). Vzhledem k tomu, že u transformovaných buněk dochází k nadprodukci Skp2, je tento protein sám o sobě považován za onkogen (Gstaiger M. *et al.*, 2001; Latres E. *et al.*, 2001).

Původně platil předpoklad, že c-Myc stimuluje promotory obsahující E-box konsenzus sekvence (Grandori C. *et al.*, 2000). V současné době však převládá názor, že c-Myc necílí specifický transkripční program, ale je naopak univerzálním zesilovačem genové exprese, který zvyšuje výkon všech aktivních promotorů (Nie Z. *et al.*, 2012). E-box dependentní transkripční aktivita c-Myc je pod kontrolou MM-1 (Myc modulator 1) represoru (Mori K. *et al.*, 1998; Kimura Y., *et al.*, 2007). V přítomnosti vIRF3 je MM-1 řízená represe c-Myc narušena. Přímá asociace vIRF3 s

MM-1 $\alpha$  vede k inhibici tvorby MM-1 $\alpha$ -c-Myc komplexu. Uvolněný c-Myc pak stimuluje transkripční aktivitu nejen *cdk4* (cyclin-dependent kinase 4) promotoru, ale i dalších promotorů regulovaných c-Myc. vIRF3 je přes vazbu na c-Myc navíc přímo asociován s *cdk4* promotorem u PEL buněk. Asociace vIRF3 s c-Myc posiluje DNA-vazebnou schopnost c-Myc a zvyšuje tak jeho transkripční aktivitu (Lubyová B. *et al.*, 2007).

Vliv vIRF3 na aktivitu a funkci c-Myc a Skp2 bude podrobněji popsán v kapitole „4. Výsledky“.

### vIRF3 a p53

p53 je prvním identifikovaným tumor supresorovým genem. Je to transkripční faktor indukovaný jako odpověď na stresové signály, jako je poškození DNA či virová infekce. Aktivace p53 vede k indukci blokace buněčného cyklu či apoptózy (Vogelstein B. *et al.*, 2000). Zeslabení funkce p53 je pak jednou z nejčastějších příčin vývoje rakoviny u člověka (Hussain S.P. a Harris C.C., 1999).

U normálních tkání je hladina p53 udržována na velmi nízké úrovni, přičemž rychlá degradace p53 je zajišťována pomocí jeho zásadního negativního regulátoru Mdm2 (murine double minute 2) E3 ubiquitin ligázy. Vystavení buněk rozdílným genotoxickým stresovým signálům, jako je poškození DNA, hypoxie či teplotní šok, vede k aktivaci p53 a jeho následné akumulaci v jádře (Maltzman W. a Czyzyk L., 1984; Kastan M.B. *et al.*, 1991).

Strukturální studie odhalily, že se p53 skládá z N-terminální transaktivační domény (TAD, AMK 1-42), domény bohaté na prolin (PRD, AMK 63-97), evolučně konzervované centrální DNA-vazebné domény (DBD, AMK 100-300), tertamerizační domény (TD, AMK 307-355) a C-terminální regulační domény (CRD, AMK 355-393) (Dai C a Gu W., 2010). Mutace p53 se nejčastěji nacházejí v oblasti DNA-vazebné domény, následkem čehož dochází ke změně jeho konformace a ke snížení specifity vazby na DNA.

Schopnost p53 působit jako specifický transkripční faktor je regulována jeho posttranslačními modifikacemi, protein-protein interakcemi a proteinovou stabilizací (Ryan K.M. *et al.*, 2001). Více než 36 různých aminokyselin může být v rámci p53 modifikováno fosforylací, acetylací, ubiquitinací, sumolyací, metylací či neddylací (Kruse J.P. a Gu W., 2009). Prvním a zásadním krokem při stabilizaci p53 je pak jeho fosforylace, jež je zajišťována širokou škálou kináz (Lees-Miller S.P. *et al.*, 1990; Shieh

S.Y. *et al.*, 1997; Banin S. *et al.*, 1998; Hirao A. *et al.*, 2000; Kruse J.P. a Gu W., 2009). Nejčastěji popisovaná fosforylace serinových (S15, S20) a threoninových (T18) zbytků vede ke zrušení vazby mezi p53 a Mdm2 a k následné stabilizaci a transkripční aktivaci p53 (Dumaz M. a Meek D.W., 1999; Teufel D.P. *et al.*, 2009). Krom toho, C-koncová fosforylace serinu (S392) aktivuje specifickou vazbu k DNA stabilizací p53 tetrameru (Sakaguchi K. *et al.*, 1997). Vzhledem k tomu, že monomerní p53 má mnohem menší afinitu k DNA, je oligomerizace dalším zásadním krokem při aktivaci transkripce pomocí p53 (McLure K.G. a Lee P.W., 1998; Poon G.M. *et al.*, 2007).

Další kovalentní post-translační modifikací ovlivňující funkci a aktivitu p53 je jeho acetylace k níž dochází prostřednictvím histon acetyltransferáz p300/CBP (CREB-binding protein) a PCAF (p300/CBP-associated factor) (Gu W. a Roeder R.G., 1997; Sakaguchi K. *et al.*, 1998). Acetylace p53 je DNA-dependentní a zahrnuje remodelaci chromatinu a tím indukcí exprese p53 cílových genů (Dornan D. *et al.*, 2003). Acetylace lyzinových zbytků v C-terminální doméně (K370, K372, K33, K381, K382 a K386) aktivuje DNA-specifickou vazbu p53, zvyšuje transkripční aktivitu a díky vzájemnému vyloučení acetylace a ubiquitinace na stejných lyzinových reziduích stabilizuje p53 (Kruse J.P. a Gu W., 2008). Acetylace K320 v tetramerizační doméně přispívá k přežití buněk aktivací genů řídících buněčný cyklus (Knights C.D. *et al.*, 2006).

HAUSP (herepsvirus-associated ubiquitin-specific protease), také známý jako USP7, je deubiquitinační enzym, jenž specificky deubiquitínuje p53 i Mdm2 (Cummins J.M a Vogelstein B., 2004; Li M. *et al.*, 2004; Li M. *et al.*, 2002), přičemž jeho preferovaným substrátem během normální homeostázy je Mdm2 (Hu M. *et al.*, 2006). Pokud je buňka vystavena stresu, dochází k fosforylaci Mdm2 ATM kinázou a dalším modifikacím, jejichž následkem je změna afinity Mdm2 k HAUSP. Uvolněný HAUSP cílí a deubiquitínuje p53 (Meulmeester E. *et al.*, 2005; Brooks C.L. *et al.*, 2007). Stabilizovaný a aktivovaný p53 pak působí jako efektivní transkripční faktor regulující expresi mnoha cílových genů včetně růstového regulačního genu p21<sup>cip1,waf1</sup> a Mdm2 a tvoří tak negativní zpětnou vazbu (Wu X. *et al.*, 1993).

Mutační analýza KSHV-infikovaných PEL buněčných linií odhalila, že většina buněk (70%) obsahuje nemutovanou formu p53 (Boulanger E. *et al.*, 2009). Absence mutací naznačuje, že si KSHV musel vyvinout odlišný mechanismus, kterým obchází klíčový tumor supresor při rozvoji KSHV-asociované neoplázie. Rivas a kol. identifikovali vIRF3 jako potenciální inhibitor p53 indukované transkripce a apoptózy a

*in vitro* prokázali interakci vIRF3 a p53 (Rivas C. *et al.*, 2001). Vzhledem k tomu, že přímá asociace endogenního vIRF3 a p53 u KSHV infikovaných PEL buněk prokázána nebyla, nebyl ani popsán přesný molekulární mechanismus, kterým vIRF3 moduluje funkci p53. Této otázce tak bude věnován prostor v kapitole „4. Výsledky“.

#### vIRF-3 a POD

Výrazný vliv vIRF-3 proteinu na buněčnou transformaci a vývoj nádoru je podpořen jeho přispěním na narušení PML (promyelocytic leukemia protein) onkogenických domén (POD). PML je multifunkční protein hrající roli v potlačení nádorového bujení a v hostitelské obraně proti virové infekci. PML je hlavním komponentem POD (známých také jako ND10 domény), jež tvoří jaderné zásobárny pro mnoho proteinů důležitých při regulaci genové transkripce, genomové stability, apoptózy a buněčného cyklu (Ischov A.M. *et al.*, 1999; Ferbeyre G. *et al.*, 2000; Yip K.W. *et al.*, 2011). Mimo PML obsahují POD některé další proteiny jako Sp100, pRB či p53 (Maul G.G., *et al.*, 2000). Exprese vIRF3 indukuje uvolnění PML z POD a následně jeho proteazomální degradaci (Marcos-Villar L. *et al.*, 2009). Umlčení exprese vIRF3 v PEL buňkách pomocí RNA interference naopak zvyšuje hladinu PML. vIRF3 také zasahuje do PML zprostředkované transkripční represe survivinu – proteinu, který přispívá k maligní progresi PEL buněk (Marcos-Villar L. *et al.*, 2009).

vIRF3 byl dále *in vitro* indentifikován jako kovalentně vazebný partner pro SUMO1 (small-ubiquitin-like modifier) a SUMO2 u KSHV infikovaných PEL buněk (Marcos-Villar L. *et al.*, 2011). SUMO je 11.5-KDa velký protein mající schopnost konjugovat s mnoha proteiny a modulovat tak jejich proteinovou stabilitu, lokalizaci, aktivitu a funkci (Zhao J., 2007). Kovalentní konjugace SUMO s vIRF3 slouží jako most mezi vIRF3 a dalšími SUMO interagujícími proteiny, jež jsou potřebné pro vIRF3 zprostředkované narušení POD (Marcos-Villar L. *et al.*, 2011). Krom toho bylo prokázáno, že vIRF3 inhibuje SUMOylaci tří proteinů, pRb, p107 a p130, jež jsou důležitými tumorsupresory často cílenými onkoproteiny exprimovanými DNA nádorovými viry (Marcos-Villar L. *et al.*, 2013). vIRF3 obsahuje LXCXE motiv, jež zprostředkovává jeho interakci s buněčnými proteiny a jež je nezbytný pro utlumení jejich konjugace se SUMO (Marcos-Villar L. *et al.*, 2013).

### vIRF3 a HIF-1

HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1) je klíčovým regulátorem buněčné odpovědi na nízkou koncentraci kyslíku zahrnutým ve vývojové a patologické angiogenezi. Během normálních podmínek podléhá HIF-1 $\alpha$ , kyslík-senzitivní podjednotka HIF-1, výrazné ubiquitinaci a proteazomální degradaci (Tanimoto K. *et al.*, 2000). Při hypoxii pak dochází ke stabilizaci a akumulaci HIF-1 $\alpha$  a k jeho transportu do jádra, kde tvoří heterodimerní komplex s HIF-1 $\beta$ . Tento komplex aktivuje transkripci cílových genů uplatňujících se při angiogenezi a nádorovém růstu (Kallio P.J. *et al.*, 1998). Jedním z těchto genů je VEGF (vascular endothelial growth factor). Přímá vazba vIRF3 k HIF-1 $\alpha$  výrazně indukuje jeho stabilitu a transkripční aktivitu a zvyšuje tak produkci VEGF, následkem čehož může dojít k proliferaci okolních buněk (Shin Y.C. *et al.*, 2008).

### vIRF3 a 14-3-3

14-3-3 proteiny tvoří rodinu vysoce konzervovaných dimerických regulačních proteinů, jež jsou zahrnuty v regulaci buněčného cyklu, apoptózy a onkogeneze (Fu H. *et al.*, 2000). 14-3-3 proteiny pomáhají udržovat členy FOXO (forkhead box O) rodiny v cytoplasmě. FOXO rodina, FOXO1, FOXO3a a FOXO4, reprezentuje transkripční faktory, jejichž aktivace vede k zastavení buněčného cyklu v G<sub>1</sub> fázi a k indukci apoptózy u mnoha nádorových buněčných linií (Brunet A. *et al.*, 1999; Gilley J. *et al.*, 2003). Fosforylace FOXO3a AKT kinázou umožní vazbu 14-3-3 proteinů, což umožní jejich přesun z jádra do cytoplasmy, kde zůstávají v neaktivní formě (Dobson M. *et al.*, 2011; Tzivion G. *et al.*, 2011). Fosforylovaný vIRF3 může interagovat s 14-3-3 proteiny a FOXO3a. vIRF3 je navíc schopný vazby na nefosforylovaný FOXO3a a ulehčuje tak vazbu mezi 14-3-3 proteiny a nefosforylovaným FOXO3a. vIRF3 tak inhibuje aktivaci FOXO3a cílových genů, jako je proapoptotický Bim. Krom toho, vIRF3 také blokuje G<sub>2</sub>/M blokaci buněčného cyklu indukovanou nadprodukcí 14-3-3 proteinů (Muñoz-Fontela C. *et al.*, 2007).

### 1.4.3. vIRF-3 a apoptóza

Aktivace ISG (IFN-responsive genes) je důležitým mechanismem pro navození úspěšné protivirové imunitní odpovědi. vIRF3 cílí funkci PKR (IFN-induced dsRNA-activated protein kinase). Exprese vIRF3 redukuje PKR-zprostředkovanou apoptózu a

vede ke snížení fosforylace eIF-2 $\alpha$  (eucaryotic initiation factor 2), jež je zajišťována PKR. Přímá interakce vIRF3 s PKR prokázána nebyla. Stejně tak vIRF3 není schopný inhibovat aktivaci NF- $\kappa$ B, nicméně vIRF3 inhibuje aktivaci kaspázy 3 indukovanou PKR (Esteban M. *et al.*, 2003).

Vliv vIRF3 na regulaci apoptózy byl popsán v několika dalších publikacích. Rivas a kol. prokázali, že vIRF3 je schopný inhibovat p53 a doxorubicinem navozenou apoptózu u Saos-2 (human osteosarcoma cell) buněk, jež mají deletovaný p53 i u U2OS (human osteosarcoma cell) buněk s wtp53 (wild-type p53) (Rivas C. *et al.*, 2001). Naproti tomu Seo a kol. publikovali, že po přidání TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha) k HEK293T (human embryonic kidney cell) buňkám je vIRF3 schopný indukovat apoptózu přes inhibici NF- $\kappa$ B aktivity (Seo T. *et al.*, 2004).

Vzhledem k těmto protichůdným závěrům je těžko odhadnutelné, zda je vIRF3 pro- či protiapoptotickým proteinem. Tento nesoulad může být zapříčiněný užitím rozdílných buněčných systémů, nadměrnou expresí exogenního vIRF3 či užitím různých reagensů pro indukci apoptózy. Nicméně studie provedená na KSHV infikovaných buňkách (BC-3, JSC-1) prokázala snížení buněčné proliferace a indukci aktivity kaspázy 3/7 po knockdownu vIRF3, díky čemuž se vIRF3 jeví spíše jako protiapoptotický a pronádorový agens (Wies E. *et al.*, 2008).

## 1.5. RNA interference

RNAi (Double-stranded RNA-mediated interference) je jednoduchá a rychlá metoda umožňující umlčení genové exprese u mnoha organismů, jejíž vývoj způsobil zásadní technologický průlom v moderní biologii.

Na počátku devadesátých let řada vědců nezávisle na sobě popsala proces, při kterém byla exprese proteinů inhibována přítomností RNA u rostlin a hub. Porozumění tomuto fenoménu, nazvanému jako “posttranskripční umlčení genů” či “quelling”, přinesla až publikace z roku 1998 (Fire A. *et al.*, 1998). Andrew Fire a Craig C. Mello, pozdější nositelé Nobelovy ceny za fyziologii a lékařství ukázali, že dvouřetězcová RNA (ds RNA) je schopná přímé sekvenčně specifické degradace mRNA (messenger RNA) a tedy specifické inhibice exprese proteinů u *Caenorhabditis elegans*. Tento proces nazvali jako “RNA interference”. Pozdější studie pak identifikovaly 2 typy

malých RNA molekul iniciujících RNAi: miRNA (micro RNA) a siRNA (small interfering RNA).

RNA interference může být iniciována endogenní (pre-mi RNA) či exogenní dsRNA, jenž aktivuje ribonukleázový komplex Dicer (Bernstein E. *et al.*, 2001). Tento komplex štěpí dsRNA na 20-25pb dlouhé fragmenty s 2-nukleotidovým přesahem na 3'konci (Castanotto D. a Rossi J.J., 2009) zvanými siRNA. Dvouřetězcová siRNA je následně rozdělena na jednotlivá vlákna. Vlákno s komplementární sekvencí k cílové mRNA (známé jako guide strand) je inkorporováno do komplexu RISC (RNA-induced silencing complex), kde dojde k štěpení příslušné mRNA, jež tak nemůže být použita jako templát pro syntézu proteinů (Ahlquist P., 2002).

Tento specifický a vysoce efektivní mechanismus inhibující genovou expresi je často využíván v experimentální biologii při studiu funkce genů v tkáňových kulturách či u živých organismů. dsRNA, se sekvencí komplementární s genem, jenž má být umlčen, je syntetizována a introdukována do buněk či organismu, kde je rozpoznána jako exogenní genetický materiál, jenž aktivuje mechanismus RNAi a způsobí tak knockdown cílového genu (Voorhoeve P.M. a Agami R., 2003). Přírodního procesu RNAi se v současnosti dále využívá v medicíně, genomice či v biotechnologiích.

## 2. Stanovené cíle a hypotézy

Hlavním cílem našeho projektu bylo přispět k porozumění KSHV-indukované neoplázie. Vzhledem k tomu, že v některých oblastech, například v subsaharské oblasti Afriky, je virem Kaposiho sarkomu nakaženo až 80% populace, je možnost celkového omezení infekce velmi nerealistická. I přes skutečnost, že se léčba pacientů s onkologickými chorobami neustále zdokonaluje, neexistuje v současnosti žádná účinná terapie pro pacienty manifestující PEL nebo Kaposiho sarkom, kteří se většinou nedožijí více jak 6 měsíců od diagnostiky onemocnění. Charakterizace funkce vIRF-3 tak může přispět k celkovému porozumění patogeneze KSHV a v budoucnu by mohla poskytnout cíle pro terapii, léčbu či prevenci tumorů asociovaných s KSHV.

Onkogenní viry vyvinuly mnoho strategií, díky kterým dokáží deregulovat zásadní biologické funkce infikovaných buněk. Ovlivňují tak buněčný cyklus, apoptózu, imunitní odpověď, epigenetickou modifikaci či signální transdukční dráhy hostitelských buněk. Tyto změny pak mohou vést k virem-indukovanému nádorovému bujení. Velmi častou příčinou vzniku nádorového bujení spojeného s virovou infekcí je disbalance funkce protoonkogenu c-Myc či klíčového tumorsupresoru p53.

Virus Kaposiho sarkomu kóduje několik genů, jejichž proteinové produkty modulují přímo či nepřímo aktivitu c-Myc. Latentní protein vFLIP aktivuje NFκB dráhu a kooperuje s c-Myc na vývoji lymfomu u myši (Ahmad A. *et al.*, 2010). vIRF4 konkuruje IRF4 při vazbě do specifické promotorové oblasti c-Myc, což vede k významné supresi exprese c-Myc (Lee H.R. *et al.*, 2014). LANA pak stabilizuje a aktivuje c-Myc pomocí kontroly jeho fosforylace (Bubman D. *et al.*, 2007; Liu J. *et al.*, 2007). Vzhledem k tomu, že c-Myc je nezbytný pro udržení latence KSHV (Li X. *et al.*, 2010), působí jako významný buněčný faktor ve vývoji neoplázie asociované s KSHV.

Naším cílem bylo navázat na práci, v níž Lubyová a kol. prokázali vliv vIRF3 proteinu na aktivaci c-Myc cílových genů (Lubyová B. *et al.*, 2007). Vzhledem k tomu, že strategie modulace stability a aktivity protoonkogenu c-Myc byla prokázána u Epstein-Barr viru (Kaiser C. *et al.*, 1999; Bajaj B.G. *et al.*, 2008), či u hepatitis B viru (Kalra N. a Kumar V., 2006), předpokládali jsme vliv vIRF3 proteinu na stabilitu c-Myc. c-Myc je protein s velmi krátkou životností, jehož proteinová stabilita je regulována ubiquitin ligázou Skp2 (S-phase kinase-associated protein 2) (Jin J. a Harper J.W., 2003; Kim S.Y. *et al.*, 2003; von der Lehr N. *et al.*, 2003; von der Lehr N. *et al.*,



2003b). Zajímalo nás tedy, zda vIRF3 protein interaguje s touto ubiquitin ligázou a zda má tato případná interakce vliv na c-Myc zprostředkovanou transkripci. Taktéž jsme se chtěli zaměřit na přímou asociaci c-Myc a vIRF3 a definovat vzájemná vazebná místa jednotlivých proteinů.

Dalším cílem naší práce bylo detailněji popsat a charakterizovat vliv vIRF3 proteinu na stabilitu a funkci tumorsupresoru p53. Asociace virových proteinů s p53 se zdá být běžným mechanismem, vyvinutým onkogenními DNA viry, jež poskytuje výhodu nad hostitelskými obrannými mechanismy a která následně vede k virem zprostředkované onkogenezi. Proteiny vázající se k p53 byly identifikovány například u HPV (Lechner M.S. *et al.*, 1992) či u Epstein-Barr viru (Yi F. *et al.*, 2009). Strategii pro efektivní inaktivaci funkce p53 během latentní i lytické replikace vyvinul i KSHV. vIRF1 je lytickým genem, který se váže do DNA-vazebné domény p53 a tlumí p53 zprostředkovanou apoptózu. Mimoto, blokováním kinázové aktivity ATM kinázy, vIRF1 negativně reguluje stabilitu p53 (Nakamura H. *et al.*, 2001; Seo T. *et al.*, 2001; Shin Y.C. *et al.*, 2006). Další lytický gen, vIRF4, reguluje funkci p53 interakcí s Mdm2 a HAUSP, což vede k proteazomální degradaci p53 (Lee H. R. *et al.*, 2009; Lee H.R. *et al.*, 2011). Latentní protein LANA tvoří v jádře infikovaných buněk komplexy s p53 (Chen W. *et al.*, 2010) a přispívá tak k indukci degradace p53 (Cai Q.L. *et al.*, 2006; Suzuki T. *et al.*, 2010). Nejméně 3 další strukturální proteiny KSHV, konkrétně ORF22 (glykoprotein H), ORF25 (významný kapsidový protein), ORF64 (tegumentový protein) a také ORF50 (RTA) dále prokazatelně inhibují aktivitu p53 a potlačují p53-indukovanou apoptózu (Chudasama P. *et al.*, 2015).

Rivas a kol. popsali *in vitro* interakci vIRF3 s p53. Tato přímá asociace vede ke snížení množství kaspázy 8 a ke specifické inhibici p53 indukované apoptózy (Rivas C. *et al.*, 2001). Přesný molekulární mechanismus, kterým vIRF3 moduluje funkci p53, však popsán nebyl. Cílem naší práce tedy bylo prokázat interakci vIRF3 a p53 v buňkách exprimujících vIRF3 a v buňkách infikovaných KSHV. Otázkou dále bylo, zda tato předpokládaná asociace může ovlivnit proteinovou stabilitu p53, tvorbu jeho aktivního tetrameru, či jeho DNA-vazebnou aktivitu. Vzhledem k tomu, že stabilita p53 je silně kontrolována jeho posttranslačními modifikacemi, zajímalo nás, zda má vIRF3 vliv na ubiquitinaci či fosforylaci p53. Krom toho jsme chtěli charakterizovat případné vazebné místo na p53, do kterého se vIRF3 váže.

Jedním z velkých cílů dále bylo zavedení metody RNA interference do naší laboratoře. Tato nová metoda by nám pomohla lépe charakterizovat vliv vIRF3 proteinu

na klíčové buněčné dráhy, jež jsou deregulované v přítomnosti KSHV, a to v přirozeném prostředí hostitelské buňky a v kontextu celého genomu KSHV.

## 3. Materiál a metody

### 3.1. Buněčné linie

KSHV-pozitivní BCBL-1 (body-cavity-based lymphoma) a BC-3 (pleural effusion B cell lymphoma, Epstein-Barr virus [EBV] negativní, s wild-type [wt] p53) buněčné linie rostly v RPMI 1640 médiu doplněném o 10% (20% u BC-3 buněk) FBS (fetal bovine serum). HeLa (cervical cancer), HEK293 (human embryonic kidney) a p53 nulitní Saos2 (human osteosarcoma) rostly v Dulbecco's modified Eagle's médiu doplněném 10% FBS. HCT-116 (human colorectal carcinoma, *wt53+/+*) byly udržovány v McCoy's 5A médiu s 10% FBS. Stabilní BJAB (Burkitt lymphoma, EBV negativní) buněčné linie transfekované vIRF3 expresním vektorem (BJAB/vIRF3) či prázdným vektorem (BJAB/pcDNA3.1) (Lubyová B. *et al.*, 2004) rostly v RPMI médiu s 10% FBS a 500 µg/ml Geneticin (G418).

### 3.2. Plazmidy a protilátky

Pro vytvoření expresního plazmidu obsahujícího vIRF3 plné délky (full-length vIRF3, vIRF3-FL 1-566 aa), byl vIRF3 ORF amplifikován pomocí RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) z RNA izolované pomocí TRIzol reagentu (Invitrogen), podle pokynů výrobce, z BCBL-1 buněk indukovaných 24hod TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate). Primery použité pro amplifikaci obsahovaly EcoRI a BamHI restrikční místo. Produkty amplifikace byly sestřiženy a vloženy do pcDNA3.1 (+) (Invitrogen). vIRF3-GST byl klonován PCR amplifikací vIRF3 cDNA z vIRF3-myc expresního plazmidu a byl vložen do pGEX4T vektoru (Amersham Biosciences). Expresní plazmid *c-myc*-HA, *cdk4* reportérový konstrukt WT MBS1-4 a p21p-luc reportérový konstrukt (WWP-luc) byly poskytnuty Dr. Bertem Vogelsteinem (Johns Hopkins University, Baltimore, MD). *skp2*-Myc a *skp2*-GST plazmidy nám poskytl Dr. Yue Xiong (lineberger Comprehensive Cancer Center, University of North Carolina at Chapel Hill, NC). *wt*p53 (1-393) expresní plazmid a plazmidy exprimující p53 deleční mutanty (p53 1-359, p53 1-292) nám poskytl Dr. Akira Nakagawara (Chiba Cancer Center Research Institute, Chiba, Japan). Různé sestřižené formy *c-myc* a *skp2* byly amplifikovány pomocí PCR za použití *c-myc*-HA a *skp2*-Myc. PCR produkty byly

klonovány mezi EcoRI/BamHI a EcoRI/HindIII místy do pcDNA3.1 vektoru. vIRF3 deleční konstrukty byly klonovány pomocí PCR amplifikace vIRF3-FL plazmidové DNA. 5'primer nesl Myc tag sekvenci, jež byla ve stejném čtecím rámci jako vIRF3 ORF. Produkty PCR byly subklonovány do pcDNA3.1 vektoru. p53 deleční konstrukty, p53 ( $\Delta$ 102-292), p53 ( $\Delta$ 326-355) a p53 ( $\Delta$ 102-292 &  $\Delta$ 326-355) byly klonovány PCR amplifikací FLp53 plazmidu skrze místně-řízenou mutagenezi. *c-Myc-GST* byl klonován PCR amplifikací *c-myc* cDNA a byl vložen do pGEX4T vektoru (Amersham Biosciences). His-Myc-Ub plazmid nám poskytl Dr. Michele Pagano (New York University, Cancer Institute, New York, NY). p53 varianty (14/19 a 22/23) nám poskytl Dr. Arnold J. Levine (Cancer Institute of New Jersey, NJ). p53-GST konstrukt byl získán od Dr. Lori Frappierové (University of Toronto, Toronto, Canada).

Všechny primery pro PCR amplifikace použité při klonování byly syntetizovány firmou Generi Biotech.. Pro vložení PCR produktů do expresního plazmidu byla amplifikovaná DNA sestřižena příslušnými restrikcními endonukleázami (Fermentas). Inserty pak byly odděleny od směsi užitím horizontální agarózové elektroforézy a následně byly purifikovány z gelu pomocí QIAquick Gel Extraction Kitu (Qiagen) dle pokynů výrobce. Pro ligaci byla použita T4 DNA ligáza (Fermentas). Sekvenční přesnost všech konstruktů byla ověřena na ABI PRISM™ 377 automated DNA sekvenátoru (Applied Biosystems).

Použity byly tyto protilátky: c-Myc (N-262), p53 (DO-1, FL-393),  $\beta$ -actin, HA, Skp2, Ub, IRF-3, IRF-4, Myc (9E10), p21, PARP, caspase-3, phospho-ATM (S1981) (Santa Cruz Biotechnology), phospho-p53 (S15 a S20), ATM (D2E2) (Cell Signaling Technology) a acetylated H3 (Upstate Millipore). vIRF3 protilátky byly získány v králíkovi proti dvěma peptidům (n-VRLEKHRRRPRPFVGEC-c and n-CWDDGPRRHERPTTRR-c) a následně byly pročištěny pomocí proteinové A chromatografie.

### 3.2.1. Izolace plazmidu

Plazmidy byly transformovány do *E. coli*, kmen DH5 $\alpha$  (Invitrogen), nebo BL21 (Stratagene) tepelným šokem při 42°C. Poté byly buňky kultivovány při 37°C přes noc v selekčním agaru s ampicilinem (100 $\mu$ g/ml; Sigma-Aldrich). 5 klonů bylo pak přeneseno do tekutého LB média a kultivováno po dobu dalších 16 hod. Plazmidy byly

z buněk izolovány pomocí Qiagen Plasmid Mini, či Qiagen Plasmid Midi Kitu (Qiagen). U BL21 buněk byl pro aktivaci lac promotoru a expresi T7 RNA polymerázy přidán IPTG (izopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranozid). Po následné inkubaci a sonifikaci byly k lyzátům přidány glutation-Sefarózové kuličky (Amersham Biosciences) a proteiny vázané na GST byly promyty pomocí PBS (phosphate buffered saline) s mixem proteázových inhibitorů (Sigma-Aldrich).

### 3.3. Reagencie a chemikálie

Buňky byly vystaveny působení 50  $\mu$ M MG132, nebo MG115 (Sigma-Aldrich), 1  $\mu$ M doxorubicinu (Sigma-Aldrich) a 25  $\mu$ g/ml cykloheximidu (Sigma-Aldrich).

### 3.4. Transfekce

Transfekce byly provedeny použitím SuperFect nebo Attractene transfekčních činidel (Qiagen) podle pokynů výrobce.

Pro studie zaměřené na životnost c-Myc, ubiquitinaci a DNA pull-down byly HEK293 nebo HeLa buňky transfekovány dvakrát: nejprve byly, pro zajištění stejné transfekční efektivity exogenního *c-myc*, transfekovány *c-myc*-HA expresním plazmidem. Po šestnácti hodinách pak byly buňky trypsinizovány a ko-transfekovány vIRF-3, *skp2*-Myc expresními plazmidy, nebo prázdným vektorem (pcDNA3.1). 24 nebo 48hod po transfekci byly buňky vystaveny působení cykloheximidu nebo MG115. Buněčné lyzáty byly analyzovány imunoprecipitací, nebo Western blotem.

Pro zjištění proteinové stability p53 a DNA pull-down u p53 byly p53 nulitní Saos2 buňky nejprve transfekovány expresními p53 plazmidy (*wt*, 14/19, nebo 22/23). 24hod po transfekci byly buňky trypsinizovány a ko-transfekovány vIRF3 expresním plazmidem, nebo prázdným vektorem (pcDNA3.1). 48hodin poté byly buňky vystaveny MG132 a/nebo doxorubicinu. Buněčné lyzáty byly analyzovány imunoprecipitací, nebo Western blotem.

Pro determinaci životnosti p53 byly exponenciálně rostoucí HCT-116 buňky transfekovány vIRF3 expresním plazmidem, nebo prázdným vektorem (pcDNA3.1). Následně byly buňky vystaveny působení cykloheximidu na 0,15,30,60,120 a 240min. Analýza proběhla pomocí Western blotu. Intenzita signálu byla kvantifikována užitím

MiniLumi Gel-Dokumentačního systému (DNR Bio-Imaging Systems). Intenzita signálu p53 byla normalizována vzhledem k signálu  $\beta$ -aktinu a poté byla analyzována s přihlédnutím k signálu získanému v čase 0 po vystavení buněk cykloheximidu.

Při proteinové cross-linking esaji byly HCT-116 buňky transfekovány vIRF3 expresním vektorem, nebo prázdným vektorem (pcDNA3.1). 24hod po transfekci byly vystaveny MG132 a doxorubicinu na 6 respektive 24hod. Poté byly buňky lyzovány v lyzačním pufru (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,5% Nonidet P-40, 1 mM NaVO<sub>3</sub>, 1 mM DTT, 1 mM PMSF a mixem proteázových inhibitorů (Sigma-Aldrich)). Následně byl k lyzátu přidán glutaraldehyd a lyzáty byly inkubovány 10min na ledu. Reakce glutaraldehydu byla zasatavena přidáním 2x loading pufru a vzorky byly analyzovány užitím Western blotu.

### 3.5. RNA interference

Syntetické siRNA cílící vIRF3 byly navrženy pomocí Sigma-Aldrich a Dharmacon siRNA designových center. Byly použity následující siRNA sekvence: si291, 5'-GGUCGUACAGGGAAUUAU-3'; si999, 5'-GGAGAUAAAGUGACGAAGAA-3'. Negativní kontrola, nonsense siRNA (siN) 5'-AAGACUACCGUUGUAUAGUAG-3', která nemá homologii k žádnému známému lidskému či KSHV genu, byla použita již dříve (Wies E. *et al.*, 2008). Pro experimenty spojené s c-Myc byly PEL buňky (BC-3) 3 dny před transfekcí siRNA udržovány v hustotě 4x10<sup>5</sup> buněk/ml. Celkově 2x10<sup>6</sup> PEL buněk bylo pak transfekováno HiPerFect transfekčním činidlem (Qiagen). Pro experimenty spojené s p53 bylo celkem 4x10<sup>6</sup> PEL buněk transfekováno pomocí X-treme GENE siRNA transfekčního činidla (Roche). Dva dny po transfekci byly buňky vystaveny doxorubicinu na 0,6,9 a 12hod. Buněčné lyzáty byly analyzovány pomocí qPCR.

### 3.6. Imunoprecipitace a Western blot

Buňky byly lyzovány ko-imunoprecipitačním pufrém (20 mM HEPES (pH 7,9), 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0,1% Nonidet P-40, 10% glycerol, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluorid a 0,2 mM mixem proteázových inhibitorů (Sigma-Aldrich)), nebo imunoblotním pufrém (20 mM Tris (pH 7,6), 150

mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluorid a 0,2 mM směs proteazových inhibitorů (Sigma-Aldrich)). Izolace C a N extraktů byla provedena s použitím kitu NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit (ThermoFisher Scientific).

Proteinové extrakty (400 µg) byly 1hod inkubovány s příslušnými protilátkami při 4°C. K extraktům bylo přidáno 25-30µl proteinových A/G-Sefarózových kuliček (Santa Cruz Biotechnology) a následovala inkubace při 4°C přes noc. Imunokomplexy byly pak důkladně promyty ko-imunoprecipitačním pufrům a analyzovány Western blotem, kdy byly vzorky po denuraci (5min 100°C) nejprve rozděleny na 10% gelu a následně byly přebírány (25V, 0,36A, 300W, 1,25hod) na PVDF membránu (BioRad). Membrána byla blokována v 5% roztoku mléka (BioRad) v TBS Tween (Sigma). Poté byly přidány primární protilátky ve 2% roztoku mléka v TBS Tween a membrána byla inkubována při 4°C přes noc. Druhý den byla membrána důkladně promyta v TBS Tween a inkubována 1hod se sekundární protilátkou konjugovanou s HRP (horseradish peroxidase). Po následném promytí byl signál detekován pomocí Super signal west Femto maximum sensitivity substrate (Pierce) a vizualizován ve fotokomóře při expozičních časech 30sec, 1min, 3min, 5min a 10min.

### 3.7. Luciferázová esej

Pro experimenty spojené s c-Myc byly 16 hod před transfekcí HEK293 buňky vysety na 6ti jamkové kultivační destičce. Buňky pak byly pomocí SuperFect transfekčního činidla (Qiagen) transfekovány stejným množstvím (1 µg) luciferázového reporterového a vIRF3, *c-myc*-HA, nebo *skp2*-Myc expresního plazmidu spolu s kontrolním plazmidem pRL-SV40 (0,1µg; Promega Corp., Madison, WI). 48hod po transfekci byly buňky lyzovány v reporterovém lyzačním pufru (Promega).

U experimentů spojených s p53 byly 16 hod před transfekcí HCT116, nebo Saos2 buňky vysety na 6ti jamkové kultivační destičce. Následovala transfekce stejného množství (1 µg) luciferázového reporterového a p21p-luc (WWP-luc) a vIRF3 (1-566), *wtp53*, nebo p53 (14/19) expresního plazmidu společně s *Renilla* luciferázovým kontrolním plazmidem pRL-SV40 (0,1µg; Promega) pomocí transfekčního činidla Attractene (Qiagen). 24hod po transfekci byly buňky dalších 24hod inkubovány v přítomnosti (+), nebo bez (-) doxorubicínu. Následovala lyze buněk v reporterovém lyzačním pufru.

Luciferázová aktivita byla měřena ve 20 µl lyzátu užitím Dual-Luciferase reporter assay kitu (Promega) dle instrukcí výrobce. Každý experiment byl zopakován 3x. Hladina aktivity *Renilla* luciferázy byla použita pro normalizaci rozdílů v transfekční účinnosti.

### 3.8. GST pull-down

*In vitro* translatované proteiny byly syntetizovány užitím TNT T7 quick coupled transcription/translation systému (Promega), nebo *Escherichia coli* T7 S30 extract system for circular DNA (Promega) podle instrukcí výrobce. GST fúzané proteiny (0,5 µg) vázané na glutation-Sefarózové kuličky (Amersham Biosciences) byly inkubovány s 3-10 µl reakční směsí sestávající se z *in vitro* translatovaných proteinů v 500 µl vazebného pufru (10 mM Tris (pH 7.6), 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA (pH 8.0), 1 mM dithiothreitol, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05% Nonidet P-40, 8% glycerol, 0,2 mM směs proteazových inhibitorů (Sigma)) při 4°C po dobu 90min či 3hod. Po pěti 10min promytí vazebným pufrem doplněným o 1% Nonidet P-40, byly proteiny vázané na kuličky rozděleny pomocí SDS-PAGE a detekovány Western blotem se specifickými protilátkami.

### 3.9. Oligonukleotidový pull-down

Dvouřetězcové oligomery korespondující s WT MBS4 v lidské *cdk4* promotorové oblasti (5'-CCCTCAGCGCATGGGTGGCGGTCACGTGCCCAGAACGTCCGG-3'; E-box sekvence je podtržena), nebo mutMBS4 (5'-CCCTCAGCGCATGGGTGGCGGTCACCTGCCCAGAACGTCCGG-3'; mutovaná E-box sekvence podtržena) a oligomery korespondující s p53 vazebným místem v lidské p21 promotorové oblasti (wtp21p, 5'-tgccatcaGGAACATGTCCcAACATGTTgagctctggca-3'; nukleotidy odpovídající p53 konsenzu jsou označeny velkými písmeny, a invariantní C/G báze jsou zvýrazněny tučně), nebo mutovaný p21 promoterová sekvence (mutp21p, 5'-tgccatcaGGAAGATCTCCcAAGATTTTgagctctggca-3'; mutované nukleotidy v p53 vazebné oblasti jsou podtrženy) byly syntetizovány a označeny biotinem na 5'konci



sense vlákna (Generi Biotech) a spojeny se streptavidinovými magnetickými kuličkami (Dyna, Invitrogen) podle instrukcí výrobce. Buněčné lyzáty (350 µg) byly inkubovány 3hod spolu s DNA vázanou na magnetické kuličky při 4°C. Po důkladném promytí lyzačním roztokem byly vázané proteiny rozděleny pomocí SDS-PAGE a detekovány Western blotem. U experimentů spojených s p53 byly buněčné lyzáty z transfekovaných buněk před inkubací s DNA navíc vystaveny působení doxorubicinu (1 µM, 6hod).

### 3.10. Chromatinová imunoprecipitační (ChIP) esej

Vazba k endogennímu promotoru p21 *in vivo* byla analyzována užitím chromatinového imunoprecipitačního kitu (Upstate Millipore) podle instrukcí výrobce. HCT-116 buňky (10<sup>7</sup>) byly transfekovány vIRF3 expresním plazmidem, nebo prázdným vektorem (pcDNA3.1). 24hod po transfekci byly buňky inkubovány v přítomnosti (+), nebo bez (-) doxorubicinu (1 µM) a MG132 (50 µM) po dobu 8, respektive 6hod. Proteiny vázané k DNA byly spojeny v přítomnosti 1% formaldehydu. Buňky pak byly resuspendovány v SDS lyzačním pufru a následovala sonikace. Po předčištění salmon sperm DNA/protein A-agarózou (Upstate Millipore), byly proteinové extrakty vystaveny imunoprecipitaci s protilátkami proti p53 (DO-1), vIRF3 a acetylovanému H3. Vzniklé imunokomplexy byly důkladně promyty a DNA byla uvolněna fenol/chloroformovou extrakcí a následně byla resuspendována v 50 µl 10mM Tris-HCl (pH 8,5). Pro prokázání odpovědi v lineárním měřítku, bylo jako templát pro PCR použito množství ředění (1, 5, 10 a 20 µl). PCR amplifikace pak byla provedena s následujícími p21 specifickými primery: p21-sense, 5'-CTCACATCCTCCTTCTTCAG-3'; p21-antisense, 5'-CACACACAGAATCTGACTCCC-3' a s GAPDH (3-phosphate dehydrogenase) primery, které byly použity jako negativní kontrola: GAPDH sense, 5'-CCCAACTTCCCGCCTCTC-3'; GAPDH antisense, 5'-CAGCCGCCTGGTTCAACTG-3' (Fulmer-Smentek S.B. a Francke U., 2001). Každý experiment byl proveden 3x.

### 3.11. Reverzní transkripce

RNA byla izolována pomocí TRIzol reagentu (Invitrogen) podle pokynů výrobce. Kontaminující genomická DNA byla degradována užitím TURBO DNase (Ambion). Integrita RNA byla vyhodnocena elektroporeticky a 0,5 - 1 µg RNA bylo použito pro reverzní transkripci použitím RevertAid first-strand cDNA synthesis kitu (Fermentas) a oligo(dT) primerů podle pokynů výrobce. p53, vIRF3, p21 a β-actin cDNA byly PCR amplifikovány za použití následujících primerů: lidský p53 sense, 5'-ACCAGGGCAGCTACGGTTTC-3', a p53 antisense 5'-CCTGGGCATCCTTGAGTTCC-3'; vIRF-3 sense, 5'-ATGATAACCGATAGGCTTGG-3', a vIRF-3 antisense 5'-GTCATCACATGTAACTGAAC-3'; lidský p21 sense, 5'-CCCAGTGGACAGCGAGCAGC-3', a p21 antisense 5'-ACTGCAGGCTTCCTGTGGGC-3'; lidský β-actin sense, 5'-GTCCTCTCCCAAGTCCACAC-3', a β-actin antisense, 5'-GGGAGACCAAAAGCCTTCAT-3'. PCR směs (10x buffer (Invitrogen), templátová DNA 4 µl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTP's, sense a antisense primery po 1 µl, Taq polymeráza (Invitrogen) 0,5 µl a destilovaná voda 36 µl) byla vložena do termálního cykléru (Mastercycler Gradient, Eppendorf) a DNA byla amplifikována za následujících podmínek:

1. 94°C/4min
2. (94°C/30sec - 58°C/30sec - 72°C/1min) 30x
3. 72°C/10min - 4°C

### 3.12. qPCR (kvantitativní PCR)

cDNA získaná reverzní transkripcí byla smíchána se specifickými próbami, nebo se SybrGreen a Universal PCR mastermixem (Applied Biosystems) Směs obsahovala 10µl mastermixu, 1 µl 20x probe, 7 µl destilované vody a 2 µl vzorků s cDNA. Kvantitativní PCR byla provedena na ABI 7300 PCR systému. Pro vytipování vIRF3 specifických siRNA byl použit SybrGreen. Pro experimenty spojené s c-Myc byla exprese gapdh a c-myc analyzována pomocí specifických primer/prób pro gapdh mRNA (Hs99999905\_m1) a c-myc mRNA (Hs00905030\_m1) (Applied Biosystems).

Relativní množství exprese *c-myc* byla stanovena pomocí  $2^{-\Delta\Delta CT}$  metody (Livak K. J. a Schmittgen T. D., 2001) a normalizována byla vzhledem k referenčnímu *gapdh* genu. Pro studium genové exprese p53 a p21 byly použity primer/prób sety pro p53 mRNA (Hs01034249\_m1), p21 mRNA (Hs00355782\_m1), a  $\beta$ -actin mRNA (Hs01060665\_g1) (Applied Biosystems). Množství p53 a p21 mRNA bylo normalizováno k  $\beta$ -actinové mRNA.

Pro analýzu vazby p53 k distálnímu p53-regulačnímu elementu na p21 promotoru byl použit ChIP-qPCR-RT<sup>2</sup> qPCR Master Mix a EpiTect ChIP qPCR primer set (GPH1011318(-)03A; SABiosciences). Získaná data byla normalizována vzhledem k vstupnímu materiálu, jenž reprezentuje množství chromatinu použitého při ChIP.

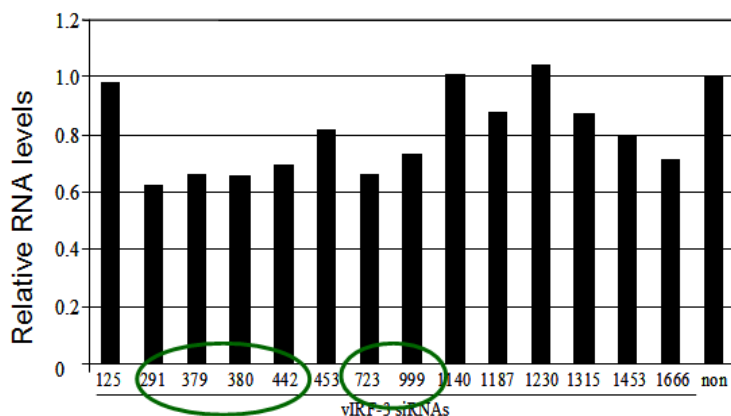
### 3.13. Statistické metody

Výsledky luciferázové eseje byly hodnoceny použitím dvouvýběrového t-testu.

## 4. Výsledky

### 4.1. Inhibiční potenciál vIRF3 specifických siRNA

Pro vytipování vIRF3 specifických siRNA, které by zajistily účinný knock-down exprese vIRF3, jsme využili Sigma-Aldrich a Dharmacon siRNA designová centra. Celkem bylo navrženo 14 vIRF3 specifických siRNA: si124, si291, si379, si380, si442, si453, si723, si999, si1140, si1187, si1230, si315, si1453 a si1666, které jsou označeny podle jejich počáteční pozice na vIRF3 cDNA. Vytipované siRNA byly spolu s nonsense siRNA transfekovány do BC-3 buněk. 2 dny po transfekci byly PEL buňky lyzovány a specifita a eficeience vIRF3 knock-downu byla stanovena pomocí real-time RT-PCR. Jak je ukázáno na obrázku 2, relativní množství vIRF3 mRNA bylo redukováno u většiny navržených siRNA. Pro další experimenty jsme si pak zvolili si291 a si999 u nichž došlo k cca 30-35% knock-downu vIRF3 mRNA oproti kontrole v podobě nonsense siRNA.

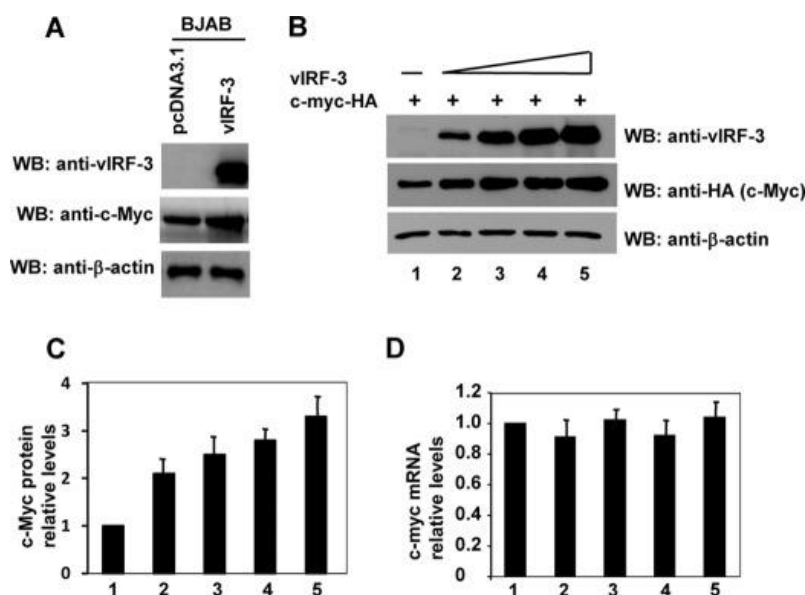


Obr. 2: Redukce množství vIRF3 mRNA u PEL buněk po knock-downu exprese vIRF3. BC-3 buňky byly transfekovány vIRF3 specifickými a nonsense siRNA. 2 dny po transfekci byla z buněk izolována RNA, jež byla analyzována pomocí real-time RT-PCR.

## 4.2. vIRF3 a c-Myc

### 4.2.1. vIRF3 reguluje stabilitu c-Myc

vIRF3 asociuje s c-myc a indukuje jeho transkripční aktivitu (Lubyová B. *et al.*, 2007), přesný mechanismus tohoto fenoménu však popsán nebyl. V naší práci jsme prokázali, že stabilní buněčná linie exprimující vIRF3 (BJAB/vIRF3), při porovnání s kontrolní buněčnou linií (BJAB/vektor), opakovaně vykazuje vyšší expresi endogenního c-Myc proteinu (Obr. 3). Pro potvrzení tohoto výchozího poznatku, jsme provedli stejný experiment u různých buněčných linií. Vzhledem k tomu, že velká část rakovinných buněk nese mutovaný c-myc, jenž je pak mnohem stabilnější než jeho *wt* forma, analyzovali jsme proteinovou stabilitu transfekovaného exogenního *wt* c-Myc-HA u HeLa buněk. Pro zajištění srovnatelné účinnosti transfekce u všech testovaných vzorků, byly HeLa buňky nejprve transfekovány c-myc-HA expresním konstruktem. Poté byly buňky trypsinizovány a transfekovány rostoucím množstvím vIRF3 expresního plazmidu. Jako je vidět na Obr. 3, zatímco množství endogenního  $\beta$ -aktinu zůstalo nezměněno, množství c-Myc-HA rostlo v závislosti na množství introdukovaného vIRF3. Obr. 3 ukazuje kvantifikaci několika nezávislých experimentů se stejnými výsledky. Transfekce vIRF3 expresního plazmidu navíc neměla vliv na relativní množství c-myc mRNA (Obr. 3), což naznačuje, že vIRF3 zvyšuje stabilitu c-Myc na úrovni proteinu.

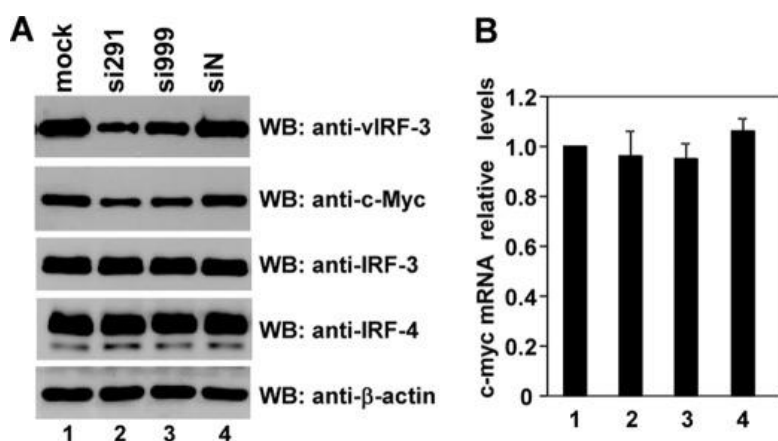


Obr. 3.: **vIRF3 zvyšuje stabilitu c-Myc.** A/ BJAB stabilní buněčná linie exprimující vIRF3 (BJAB/vIRF3) vykazuje vyšší množství c-Myc proteinu v porovnání s kontrolními buňkami (BJAB/pcDNA3.1). WB, Western blot. B/ HeLa buňky byly ko-transfekovány konstantním množstvím *c-myc*-HA a vzrůstajícím množstvím vIRF3 expresního plazmidu (0, 0,5, 1,5, 3,0 a 6,0 μg). 48hod po transfekci byly připraveny proteinové extrakty. Proteiny byly separovány na 10% polyakrylamidovém gelu a blotovány s anti-HA (c-Myc), anti-vIRF3 a anti-β-aktinovými protilátkami. C/ kvantifikace signálů z obrázku B. Množství c-Myc bylo normalizováno vzhledem k signálu β-aktinu a poté vztaženo k signálu získaného při transfekci 0 μg vIRF3. D/ celková RNA byla izolována z buněk použitých na obrázku B a analyzována pomocí real-time RT-PCR. Použity byly *c-myc* a *gapdh* specifické próby. Chybové úsečky reprezentují odchylku u čtyřech nezávislých experimentů. Každý experiment byl proveden v duplikátech.

#### 4.2.2. Knockdown exprese vIRF3 vede ke snížení proteinové stability c-Myc

Pro potvrzení, zda tento objevený fenomén působí také v přirozeném prostředí, jsme použili metodu RNA interference. Exprese vIRF3 byla knock-downována u KSHV-pozitivní PEL buněčné linie BC-3. Tyto buňky byly buď transfekovány za nepřítomnosti DNA (mock), nebo byly transfekovány nonsense siRNA či vIRF3 specifickou siRNA (si291, nebo si999). 2 dny po transfekci byly PEL buňky lyzovány. Množství proteinů bylo analyzováno Western blotem a denzitometricky kvantifikováno (Obr. 4). Množství vIRF3 proteinu bylo redukováno z 63% (si291), respektive z 41% (si999) (Obr. 4). Množství aktinu zůstalo stejné u všech testovaných vzorků. Exprese nonsense siRNA neměla žádný efekt na množství vIRF3. Knock-down vIRF3 byl přímo asociován s redukcí c-Myc proteinu o 58% (si291), respektive o 35% (si999) (Obr. 4). Pozorovaná redukce c-Myc proteinu detekovaná pomocí Western blotu však nebyla

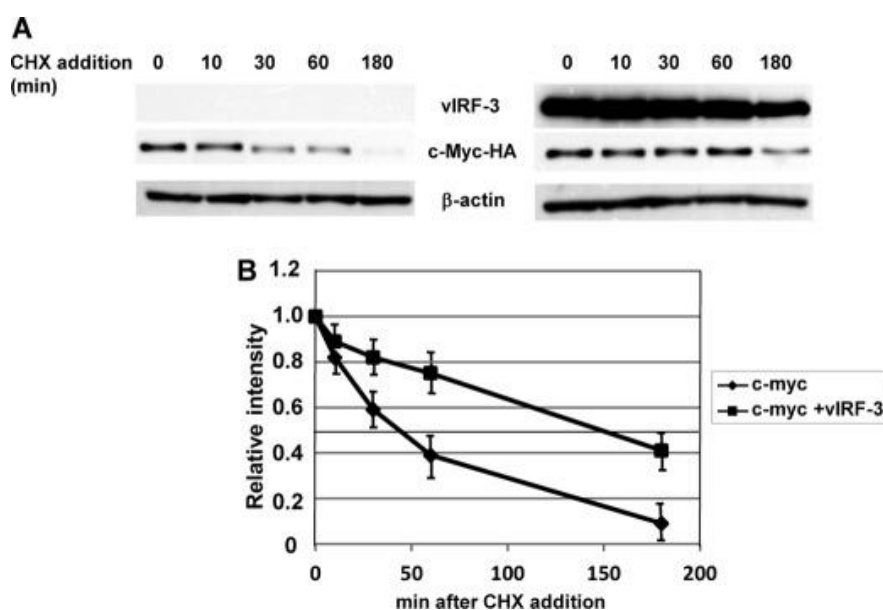
zaznamenána na úrovni RNA. Výsledky real-time RT-PCR prokazují, že hladina *c-myc* mRNA zůstala nezměněná u všech testovaných vzorků (Obr. 4). Pro vyloučení nespecifického efektu použitých siRNA byla provedena expresní analýza nejbližších homologů vIRF3 - IRF-3 a IRF-4, které sloužily jako negativní kontrola. Jak ukazuje Obr.4, si291 ani si999 neovlivnily expresi buněčného IRF-3 a IRF-4, z čehož usuzujeme, že exprese vIRF3 vede ke zvýšení stabilizace a akumulace c-Myc proteinu v KSHV-pozitivních PEL buňkách.



Obr. 4.: **Redukce c-Myc proteinu v PEL buňkách po knock-downu exprese vIRF3.** A/ BC-3 buňky byly buď mock-transfekovány, nebo transfekovány nonsense siRNA (siN), či vIRF3 specifickou si RNA (si291 a si999). 2 dny po transfekci byla polovina buněk sklizena a 8 µg proteinu bylo analyzováno pomocí Western blotu (WB) s anti-vIRF3, anti-c-Myc, anti-β-aktin, anti-IRF3 a anti-IRF4 protilátkami. B/ druhá polovina použitých BC-3 buněk byla sklizena pro izolaci celkové RNA a analyzována real-time RT-PCR metodou s *c-myc* a *gapdh* specifickými próbami. Intervaly spolehlivosti reprezentují odchylku u čtyřech nezávislých experimentů. Každý experiment byl proveden v duplikátech.

#### 4.2.3. vIRF3 prodlužuje životnost c-Myc proteinu

Pro potvrzení vlivu vIRF3 na zvýšení stability c-Myc, jsme prověřili životnost (half-life) c-Myc proteinu u HeLa buněk po působení inhibitoru proteinové syntézy, cykloheximidu (Obr. 5A). Western blotová analýza extraktů získaných z HeLa buněk transfekovaných buď samotným *wt c-myc*-HA, nebo spolu s vIRF3 a vystavených cykloheximidu prokázala, že v přítomnosti vIRF3 dochází k signifikantní stabilizaci c-Myc. Zatímco half-life samotného *wt c-Myc* byl okolo 40min, v přítomnosti vIRF3 byl half-life c-Myc značně prodloužen a dosahoval okolo 150min. Obr. 5B pak znázorňuje kvantifikaci vícero nezávislých experimentů se stejnými výsledky.



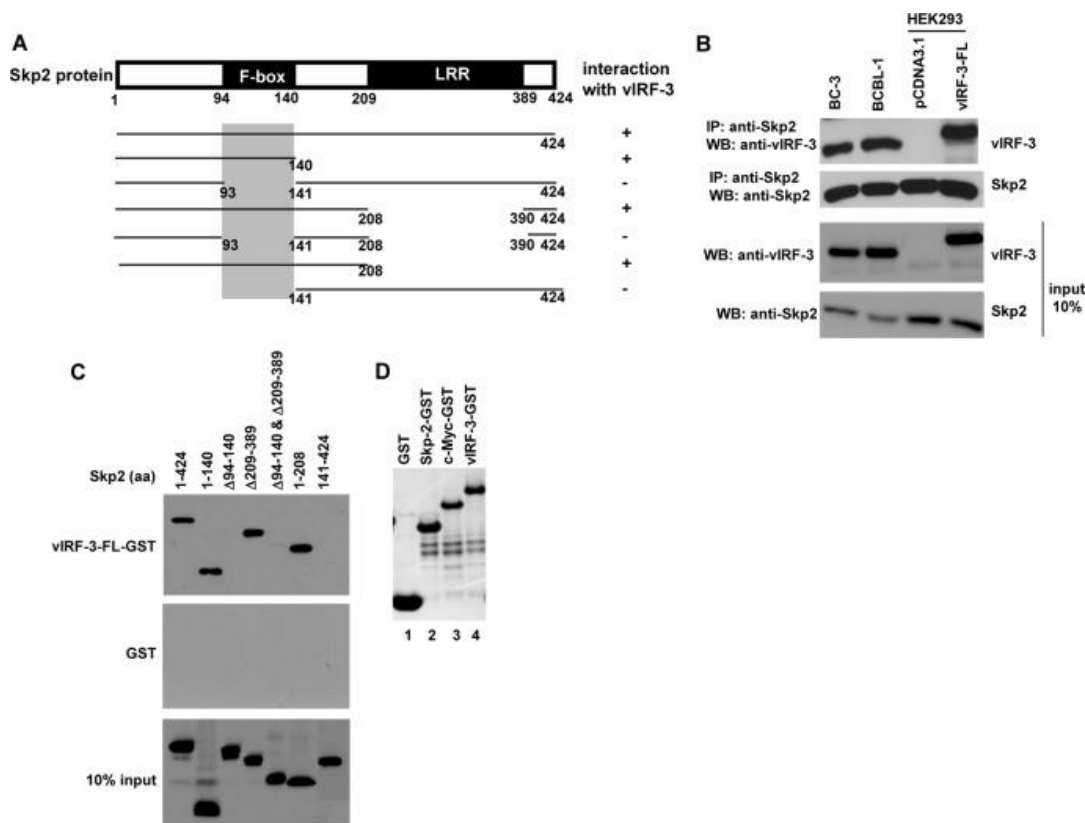
Obr. 5.: **Expresse vIRF3 zvyšuje životnost c-Myc.** A/ HeLa buňky byly ko-transfekovány konstantním množstvím c-myc-HA, vIRF3 nebo pcDNA3.1 expresního plazmidu. 48hod po transfekci byly buňky vystaveny působení 25  $\mu$ g cykloheximidu (CHX) po dobu indikovanou na obrázku. Buněčné lyzáty pak byly analyzovány Western blotem s anti-HA (c-Myc), anti-vIRF3 a anti- $\beta$ -aktinovými protilátkami. B/ kvantifikace signálů z imunoblotu na Obr. A. c-Myc byl normalizován k signálu  $\beta$ -aktinu a poté byl vztažen vzhledem k signálu získanému v čase 0 působení cykloheximidu. Chybové úsečky reprezentují odchylku u čtyřech nezávislých experimentů. Každý experiment byl proveden v duplikátech.

#### 4.2.4. Skp2 F-box doména je dostatečná pro interakci s vIRF3

c-Myc je transkripční faktor s krátkou životností. Jeho rychlá degradace je zprostředkována ubiquitin/proteazomální dráhou zahrnující Skp2 jako hlavní c-Myc-specifickou E3 ubiquitin ligázu (Salghetti S.E. *et al.*, 1999; Kim S.Y. *et al.*, 2003). Na základě našich zjištění jsme chtěli prozkoumat, zda může vIRF3 asociovat s komponenty SCF<sup>skp2</sup> ubiquitin ligázového komplexu a regulovat tak stabilitu c-Myc. Ko-imunoprecipitační experimenty ukázaly, že endogenní vIRF3 asociuje s Skp2 u BC-3 a BCBL-1 PEL buněk (Obr. 6B). Tyto výsledky pak byly dále podpořeny ko-imunoprecipitací transfekovaného vIRF3 a endogenního Skp2 u HEK293 buněk. Pro identifikaci oblasti na Skp2, jenž interaguje s vIRF3, jsme vytvořili různé *skp2* deleční mutanty (Obr. 6A). Interakce vIRF3/Skp2 byla následně analyzována pomocí GST pull-down metody s GST-vázanými vIRF3 plné délky (full-length vIRF3). Kvalita pročištěných rekombinantních GST a vIRF3-GST je ukázána na Obr. 6D, sloupec 1,



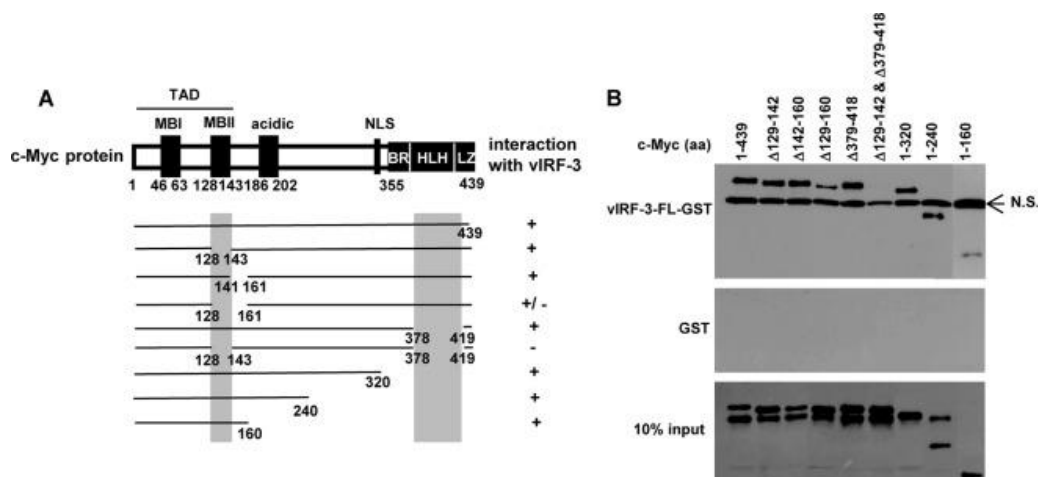
respektive sloupec 4. Tato analýza prokázala, že pro interakci s vIRF3 je důležitá oblast na Skp2, jež tvoří F-box (aminokyseliny 94-140) (Obr. 6C). Žádný z fragmentů Skp2 se nevázal s kontrolním GST, což potvrzuje specifitu vazby k vIRF3. Vzhledem k tomu, že je F-box doména odpovědná za ubiquitinační aktivitu Skp2 (Kim S.Y. *et al.*, 2003), může interakce vIRF3 s touto doménou zasahovat do jeho vlivu na regulaci stability c-Myc.



Obr. 6.: **vIRF3 interaguje s F-boxem Skp2.** A/ schématické znázornění Skp2 delečních mutant obsahujících myc tag. Vystínovaná oblast reprezentuje vIRF3-vazebnou doménu. *LRR*, oblast bohatá na leucin (leucine-rich region). B/ ko-immunoprecipitace Skp2 a vIRF3 v PEL buňkách BC-3 a BCBL-1 a v transfekovaných HEK293 buňkách. Proteinové lyzáty (400μg), byly imunoprecipitovány (IP) s anti-Skp2 protilátkami a imunoprecipitované komplexy byly analyzovány Western blotem (WB) s anti-vIRF3 protilátkami. Pro srovnání je znázorněno relativní množství Skp2 a vIRF3 ve 40 μg proteinového lyzátu (input 10%). Vyšší molekulární hmotnost transfekovaného vIRF3-FL je zapříčiněná přítomností Myc-His tagu na jeho C-konci. C/ Myc-tagované *skp2* deleční mutanty byly *in vitro* translatovány pomocí TNT T7 quick coupled transcription/translation systému a inkubovány s vIRF3-FL fúzovaným s GST, nebo GST samotným, jež byly imobilizovány na glutation-Sefarózových kuličkách. Vázané proteiny byly analyzovány pomocí Western blotu s anti-Myc (9E10) protilátkami. 10% vstupního proteinu různých Skp2 delečních mutant je znázorněno dole (10% input). aa, aminokyseliny (amino acids). D/ Barvení Coomassie Blue pročištěného GST, Skp2-GST, c-Myc-GST a vIRF3-GST pužitých při GST pull-down experimentech.

#### 4.2.5. Aminokyseliny 129-142 a 379-418 na c-Myc jsou důležité pro interakci s vIRF3

c-Myc protein obsahuje několik vysoce konzervovaných oblastí (Obr. 7A). N-koncová část proteinu nese dvě domény, jež jsou důležité pro interakci s SCF. První doména (aminokyseliny 45-63) interaguje s SCF<sup>fbw7</sup> ubiquitin ligázovým komplexem, zatímco vzdálenější region (aminokyseliny 129-147) interaguje s SCF<sup>skp2</sup> ubiquitin ligázovým komplexem. C-koncová oblast c-Myc obsahuje vazebnou/dimerizační doménu (binding/dimerization domain, BR-HLH-LZ). Funkcí této domény je tvorba specifických homo- a heterodimerů skrze helix-loop-helix-leucinový zip (HLH-LZ) a interakce s DNA skrze BR region (basic region) (Blackwood E. a Eisenman R., 1991; Prendergast G. a Ziff E., 1991; Lüscher B. a Larsson L., 1999). Uvnitř této domény je pak oblast (aminokyseliny 379-418) kam se váže Skp2 ubiquitin ligáza (Kim S.Y. *et al.*, 2003). Interakce c-Myc s vIRF3 byla prokázána již dříve (Lubyová B. *et al.*, 2007), nicméně specifikována nebyla. Pro přesné mapování oblastí c-Myc interagujících s vIRF3 jsme použili množství *c-myc* delečních mutant (Obr. 7A), které byly *in vitro* translatovány a použity pro GST pulldown esej s vIRF3-GST rekombinantním proteinem (Obr. 7B). Ze všech testovaných delečních mutant pouze jedna - c-Myc Δ129-142 a Δ379-418 - nebyla schopná vazby k vIRF3-GST. Tyto výsledky naznačují, že v rámci c-Myc proteinu existují nejméně dvě oblasti, které jsou důležité pro asociaci s vIRF3. V C-koncové oblasti proteinu c-Myc je vazebné místo pro vIRF3 lokalizováno mezi aminokyselinami 379-418. Na N-terminální části c-Myc proteinu se pak vazebná doména (aminokyseliny 129-142) shoduje s vysoce konzervovaným elementem MBII (Myc box II). Tato oblast je důležitá nejen pro proteolýzu c-Myc, ale také pro aktivaci c-Myc zprostředkované transkripce a schopnost indukce onkogenní transformace (Grandori C. *et al.*, 2000).



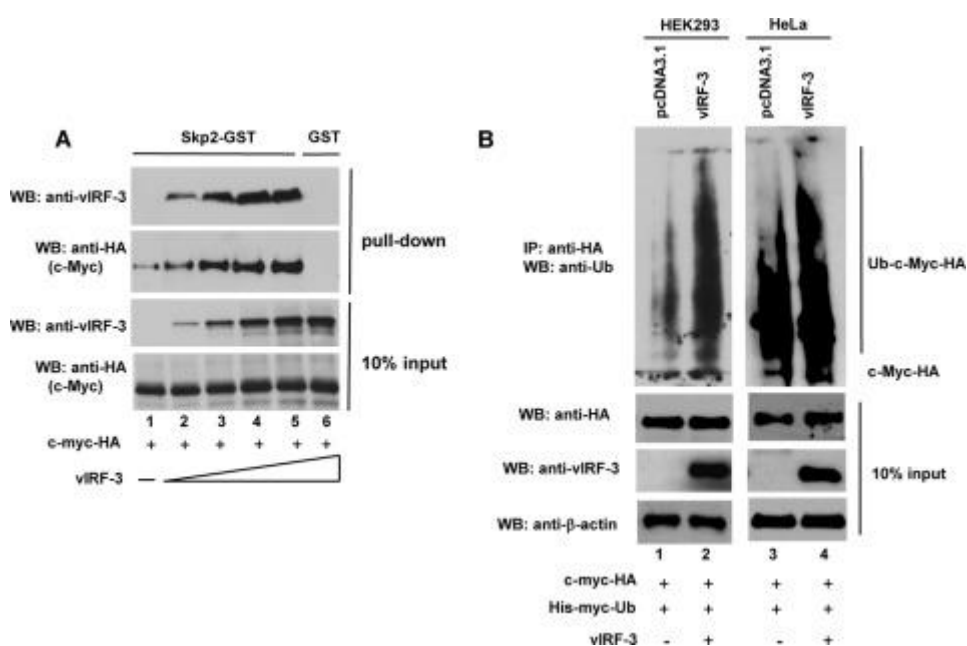
Obr. 7.: **Analýza interakce c-Myc a vIRF3.** A/ schématické zobrazení *c-myc* delečních konstruktů. Vystínované oblasti reprezentují vIRF3-vazebné domény. *MBI* a *MBII*, Myc konzervované domény I a II (Myc conserved domains); *TAD*, transkripční aktivační doména (transcription activation domain); *NLS* jaderná lokalizační signální sekvence (nuclear localization signal); *BR*, BR region (basic region); *HLH*, helix-loop-helix; *LZ*, leucinový zip (leucine zipper). B/ HA-tagované *c-Myc* deleční mutanty byly translatovány *in vitro* pomocí TNT T7 quick coupled transcription/translation systému a inkubovány s vIRF3-FL fúzovaným s GST nebo s GST samotným, jež byly imobilizovány na glutation-Sefarozových kuličkách. Vázané proteiny byly analyzovány pomocí Western blotu s anti-HA protilátkami. 10% vstupního proteinu různých *c-Myc* delečních mutant je znázorněno dole (10% input). aa, aminokyseliny (amino acids); N.S., nespecifický signál.

#### 4.2.6. vIRF3 není schopný inhibovat Skp2/c-Myc interakci ani blokovat ubiquitinaci c-Myc

Vzhledem k tomu, že se vIRF3 i Skp2 mohou vázat do stejné domény na c-Myc proteinu, zkoumali jsme, zda může vIRF3 narušovat c-Myc/Skp2 interakci. Pro toto zjištění jsme inkubovali konstantní množství *in vitro* translatovaného *c-myc*-HA spolu se zvyšujícím se množstvím *in vitro* translatovaného vIRF3 proteinu. Vazebná schopnost vIRF3 a c-Myc k Skp2-GST byla stanovena užitím GST pulldown esaje (kvalita purifikovaného rekombinantního Skp2-GST proteinu je zobrazena na Obr. 6D, sloupec 2). Oba testované proteiny, c-Myc i vIRF3, interagovaly s Skp2-GST (Obr. 8A). V přítomnosti vIRF3 navíc vazebná schopnost c-Myc k Skp2 prokazatelně vzrůstá a to v závislosti na množství vIRF3. Tyto data naznačují, že heterodimer c-Myc/vIRF3 má vyšší vazebnou afinitu k Skp2 než c-Myc samotný.

Vzhledem k tomu, že v přítomnosti vIRF3 vzrůstá schopnost interakce c-Myc s Skp2, testovali jsme ubiquitinační status c-Myc v buňkách exprimujících vIRF3. HEK293 a HeLa buňky byly nejdříve transfekovány konstantním množstvím His-Myc-

tagovaného ubiquitinu (His-Myc-Ub) a *c-myc*-HA expresního konstruktů. Po tomto prvním kole transfekce byly buňky trypsinizovány a transfekovány vIRF3 expresním plazmidem nebo prázdným vektorem (pcDNA 3.1). c-Myc byl pak imunoprecipitován z buněčných lyzátů a množství ubiquitinace bylo stanoveno Western blotem s anti-Ub protilátkami (Obr. 8B). Přesto, že u buněk transfekovaných prázdným vektorem byl c-Myc již ubiquitinován (Obr. 8B, sloupce 1 a 3), ko-transfekce s vIRF3 expresním vektorem vedla k prokazatelnému nárůstu ubiquitinace c-Myc u obou buněčných linií (Obr 8B, sloupce 2 a 4).



Obr. 8.: **vIRF3 není schopen inhibovat c-Myc/Skp2 interakci ani blokovat ubiquitinaci c-Myc.** A/ zesilující vazba c-Myc k Skp2 v přítomnosti vIRF3. Konstantní množství *in vitro* translatovaného c-Myc-HA proteinu bylo inkubováno s Skp2-GST imobilizovaném na glutation-Sefarózových kuličkách v přítomnosti vzrůstajícího množství *in vitro* translatovaného vIRF3. Vázané proteiny byly analyzovány pomocí Western blotu (WB) s anti-HA (c-Myc) a anti-vIRF3 protilátkami. Schopnost vazby k GST kuličkám představuje negativní kontrolu (sloupec 6). 10% vstupního c-Myc a vIRF3 proteinu je znázorněno dole (10% input). B/ zvýšená ubiquitinace c-Myc v buňkách exprimujících vIRF3. HEK293 (sloupec 1 a 2) a HeLa (sloupec 3 a 4) buňky byly nejprve ko-transfekovány stejným množstvím c-Myc-HA a His-Myc-Ub a následně byly transfekovány prázdným vektorem (pcDNA3.1) nebo vIRF3 expresním plazmidem. Buňky pak byly vystaveny působení proteazomálního inhibitoru (50 μM MG115, 3 hod). Buněčné lyzáty (400 μg) byly analyzovány imunoprecipitací (IP) s anti-HA specifickými protilátkami. Následoval Western blot s anti-Ub protilátkami. Relativní množství transfekovaného c-myc-HA a vIRF3 ve 40 μg buněčného lyzátu bylo stanoveno Western blotem (10% input).

#### 4.2.7. vIRF3 spolupracuje s Skp2 při aktivaci c-Myc cílových genů

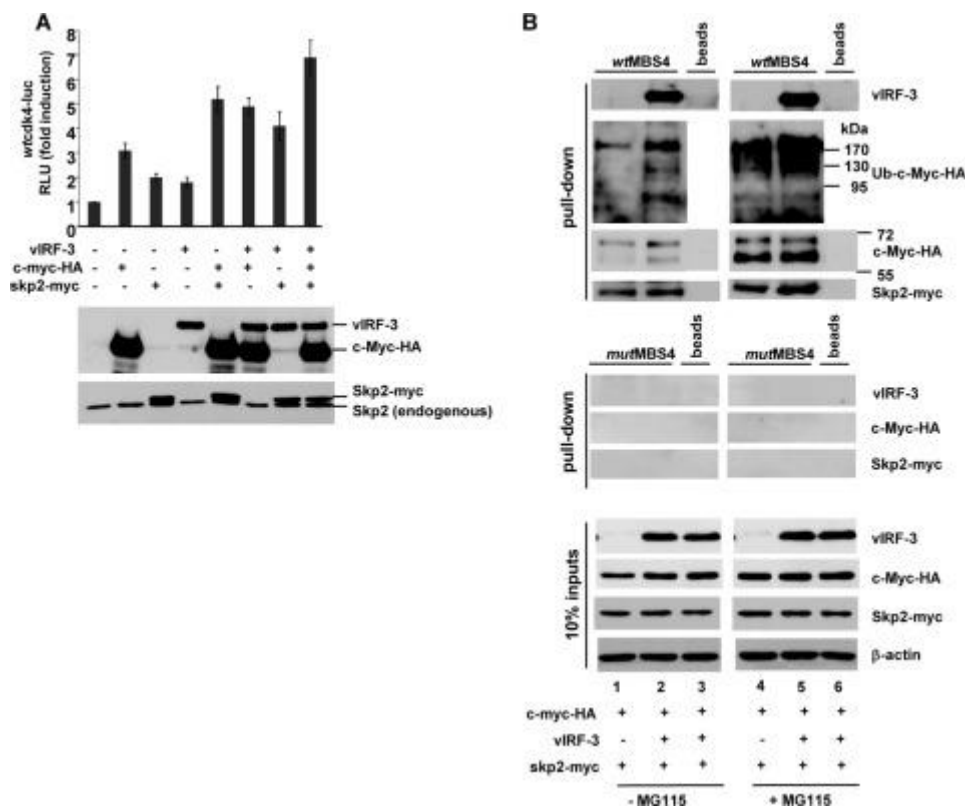
Skp2 je dáván do souvislosti nejen jako degradátor c-Myc, ale také jako transkripční koaktivátor c-Myc proteinu (Jin J. a Harper J.W., 2003; Kim S.Y. *et al.*, 2003; von der Lehr N. *et al.*, 2003; von der Lehr N. *et al.*, 2003b). Již dříve bylo prokázáno, že vIRF3 může stimulovat c-Myc regulovanou transkripci (Lubyová B. *et al.*, 2007). Tato stimulace je následkem asociace vIRF3 s c-Myc, jež vede k vazbě vIRF3-c-Myc komplexu na E-box sekvence v promotoru WT *cdk4* genu. *cdk4* promotor obsahuje 4 c-Myc vazebná místa (MBS1-4). Mutační analýza jednotlivých MBS elementů prokázala, že pro transaktivaci *cdk4* promotoru v souvislosti s c-Myc jsou zásadní MBS3 a MBS4 elementy (Hermeking H. *et al.*, 2000). Vzhledem k tomu, že vIRF3 stimuluje asociaci mezi c-Myc a Skp2, testovali jsme, zda může vIRF3 dále přispívat k aktivaci WT *cdk4* promotoru v buňkách exprimujících *c-myc* i *skp2* geny. Pro toto zjištění jsme transfekovali HEK293 buňky *c-myc*-HA, vIRF3 a *skp2* expresními plazmidy společně s reportérovým konstruktem nesoucím luciferázový gen (jehož exprese je regulována *cdk4* promotorem). Přesto, že samotný c-Myc aktivoval *cdk4* promotor přibližně 3x, ko-transfekce *skp2* nebo vIRF3 vedla k dalšímu zesílení *cdk4* promotorové aktivity a to 5,2x v případě *skp2*, či 4,9x v přítomnosti vIRF3 (Obr. 9A). Ko-transfekce všech tří expresních plazmidů - *c-myc*-HA, *skp2* a vIRF3 - pak vedla k ještě výraznější aktivaci transkripce (7x) vedené z *cdk4* promotoru. Tyto výsledky tak podpořily naše dřívější pozorování a potvrzují, že vIRF3 spolupracuje s Skp2 při aktivaci c-Myc regulované transkripce.

Pro zjištění molekulárního mechanismu, který je za tímto fenoménem, jsme analyzovali proteinový komplex, jenž se tvoří na WT *cdk4* promotoru pomocí DNA pulldown eseje. Oligodeoxynukleotidy, jež souhlasí s MBS4 sekvencí lidského WT *cdk4* promotoru, byly biotinovány, spojeny se streptavidinem obalenými magnetickými kuličkami a inkubovány s proteinovými extrakty izolovanými z HEK293 buněk, jež byly transfekovány *c-myc*-HA, *skp2* a vIRF3 expresními plazmidy. vIRF3, c-Myc-HA a Skp2 proteiny specificky navázané na WT MBS4 deoxynukleotidové sekvence byly detekovány Western blotem (Obr. 9B, nahoře). V přítomnosti vIRF3 dochází ke zvýšení asociace c-Myc s WT *cdk4* MBS4 oblastí (Obr. 9B, sloupec 2 a 5). Stejně tak Skp2 samotný se váže na MBS4 oligodeoxynukleotidy. Zajímavé však je, že v buňkách exprimujících vIRF3 dochází k zesílení asociace Skp2 s touto sekvencí. Delší expozice Western blotu pak prokázala asociaci vysokomolekulárního c-Myc (75-200 kDa) s WT

*cdk4* promotorem. Vystavení buněk působení proteazomálního inhibitoru MG115 (Obr. 9B, sloupec 4 a 5) dále vedlo ke zvýšení množství vysokomolekulárního c-Myc přítomného na promotoru, což naznačuje, že tato forma c-Myc odpovídá ubiquitínovanému c-Myc proteinu. V přítomnosti vIRF3 pak dochází k prokazatelnému zvýšení asociace Ub-c-Myc s *cdk4* promotorem (Obr. 9B, sloupec 2 a 5). Pro zjištění specifity vazby c-Myc-Skp2-vIRF3 komplexu na WT MBS4 sekvenci jsme provedli DNA pulldown analýzu s mutovaným MBS4 oligodeoxynukleotidem - mutMBS4 - nesoucím záměnu jednoho nukleotidu uvnitř E-box elementu (CACGTG → CACCTG). Hermeking *et al.* již dříve prokázal, že tato částečná mutace MBS4 sekvence má za následek zřetelné snížení aktivace *cdk4* luciferázového reporterového genu (Hermeking H. *et al.*, 2000). Jak je vidět na Obr. 9B uprostřed, žádný z komponentů c-Myc-Skp2-vIRF3 komplexu nebyl schopný vazby k mutovanému MBS4 oligodeoxynukleotidu, což potvrzuje specifitu vazby komplexů na WT MBS4 element. V souhrnu pak tato data ukazují, že c-Myc, jeho ubiquitínovaná forma, Skp2 a vIRF3 tvoří multikomponentální transkripční komplex, jenž se assemblinguje na *cdk4* promotoru a aktivuje jeho transkripci.

#### 4.2.8. c-Myc a Skp2 interagují s vIRF3 (aminokyseliny 346-455)

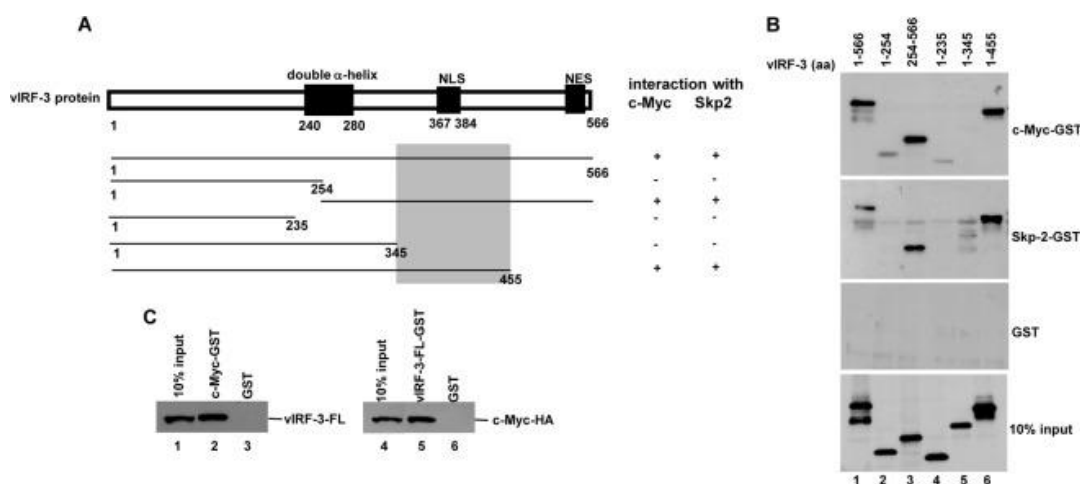
Pro doplnění porozumění vzájemné interakce vIRF3, c-Myc a Skp2 proteinů, jsme analyzovali oblast na vIRF3, která je potřebná pro vazbu c-Myc a Skp2. Pro GST pulldown experimenty byly použity *in vitro* translatované vIRF3 deleční mutanty spolu s GST-tagovanými c-Myc a Skp2 rekombinantními proteiny (Obr. 10B; kvalita pročištěného rekombinantního Skp2-GST a c-Myc-GST je ukázána na Obr. 6D, sloupec 2 a 3). Tato analýza identifikovala doménu uvnitř C-koncové poloviny vIRF3 proteinu (aminokyseliny 346-455), jež je podstatná pro interakci s c-Myc, stejně tak jako s Skp2. Specifita této interakce byla potvrzena chybějící vazbou samotného GST k jednotlivým vIRF3 delečním mutantům. Schopnost c-Myc a Skp2 interagovat se stejnou doménou vIRF3 je zajímavá a podporuje naši myšlenku, že Skp2 i vIRF3 jsou komponenty aktivačního komplexu zahrnutého v aktivaci transkripce zprostředkované c-Myc.



Obr. 9.: **vIRF3 spolupracuje s Skp2 při aktivaci c-Myc zprostředkované transkripce.** A/ efekt vIRF3 na aktivaci *cdk4* promotoru. Lidský WT (wild-type) *cdk4* reportérový konstrukt (WT MBS1-4) a pRL-SV40 plazmid byly ko-transfekovány do HEK293 buněk spolu s prázdným vektorem (pcDNA3.1) nebo s *c-myc-HA*, vIRF3 a *skp2-Myc* expresními plazmidy. Luciferázová aktivita byla analyzována 48hod po transfekci jako násobek aktivace vztažené k bazálnímu množství reportérového genu v přítomnosti kontrolního vektoru (pcDNA3.1). Výsledky byly normalizovány vzhledem k *Renilla* luciferázové aktivitě. Chybové úsečky reprezentují odchylku u tří nezávislých experimentů. Exprimované množství transfekovaných proteinů je ukázáno dole. *RLU*, relativní množství luciferázy (relative luciferase units). B/ asociace c-Myc, vIRF3 a Skp2 s WT *cdk4* promotorem byla analyzována DNA pulldown esejí. HEK293 buňky byly transfekovány *c-myc-HA*, vIRF3 a *skp2-Myc* expresními plazmidy. 24 hod po transfekci byly (nebo nebyly) buňky vystaveny působení 50μM MG115 po dobu 3 hod. Buněčné lyzáty (350μg) pak byly inkubovány spolu s WT *cdk4* promotorovými oligodeoxynukleotidy (WT MBS4) navázanými na magnetické kuličky. Přítomnost c-Myc-HA, vIRF3 nebo Skp2 proteinu na promotorové sekvenci byla prokázána Western blotem s anti-HA, anti-vIRF3 a anti-Myc (9E10) specifickými protilátkami (nahore). Vazba na samotné kuličky (sloupec 3 a 6) představuje negativní kontrolu. Vazba na mutovaný *cdk4* promotor (mutMBS4) sloužila jako negativní kontrola (uprostřed). Relativní množství transfekovaných vIRF3, c-Myc-HA a Skp2-Myc ve 35μg buněčného extraktu bylo stanoveno Western blotem (10% input, dole).

Tyto výsledky, jenž naznačují interakci c-Myc a Skp2 se stejnou doménou vIRF3 a stejně tak domněnka, že se vIRF3 váže do stejné oblasti c-Myc proteinu, jenž usnadňuje tvorbu c-Myc/Skp2 komplexu, nás velmi zaujaly. Nicméně zde mohla být možnost, že *in vitro* translatované proteiny, použité při GST pulldown esejí, mohly být kontaminovány Skp2 proteinem přítomným v surovém retikulocytovém lyzátu. Za těchto podmínek by mohl Skp2 sloužit jako most, jenž pomáhá asociaci vIRF3 s c-Myc

za tvorby ternárního komplexu. Rozhodli jsme se tedy potvrdit interakci vIRF3/c-Myc využitím systému v němž není přítomen Skp2 ani žádný jiný eukaryotický protein. Použili jsme tedy prokaryotický cell-free translační systém (*E. coli* T7 S30 extract system for circular DNA). Takto *in vitro* translatovaný vIRF3 (Obr. 10C, vlevo, sloupec 1), nebo c-Myc-HA (Obr. 10C, vpravo, sloupec 4) jsme inkubovali spolu s c-Myc-GST, nebo vIRF-GST. I v nepřítomnosti Skp2 jsme zaznamenali interakci mezi vIRF3 a c-Myc (Obr. 10C), což dokazuje tvorbu vIRF3-c-Myc komplexu následkem jejich přímé interakce. Specifita interakce byla potvrzena absencí vazby samotného GST k *in vitro* translatovaným vIRF3 a c-Myc-HA.



Obr. 10.: c-Myc a Skp2 interagují s vIRF3 (aminokyseliny 346-455). A/ schématické znázornění jednotlivých vIRF3 N- a C-koncových delečních mutant. Vystínovaná oblast znázorňuje doménu postačující pro vazbu c-Myc a Skp2. *NLS*, jaderný lokalizační signál (nuclear localization signal); *NES*, jaderný exportní signál (nuclear export signal). B/ vIRF3 deleční mutanty byly *in vitro* translatovány pomocí TNT T7 quick coupled transcription/translation systému a inkubovány spolu s c-Myc nebo Skp2 fúzovanými s GST nebo s GST samotným, jež byly imobilizovány na glutation-Sefarózových kuličkách. Vázané proteiny byly analyzovány Western blotem s anti-vIRF3 protilátkami. 10% vstupního vIRF3 delečního mutančního proteinu je znázorněno dole (10% input). aa, aminokyseliny (amino acids). C/ vIRF3 (vlevo), nebo c-Myc-HA (vpravo) byly translatovány *in vitro* pomocí *E. coli* T7 S30 extract systému a inkubovány s c-Myc-GST nebo vIRF3-FL-GST. Inkubace se samotným GST sloužila jako negativní kontrola. Vázané proteiny byly analyzovány Western blotem s anti-vIRF3 nebo anti-HA protilátkami. 10% vstupního *in vitro* translatovaného vIRF3 nebo c-Myc-HA proteinu je znázorněno vlevo (10% input, sloupec 1 a 4).

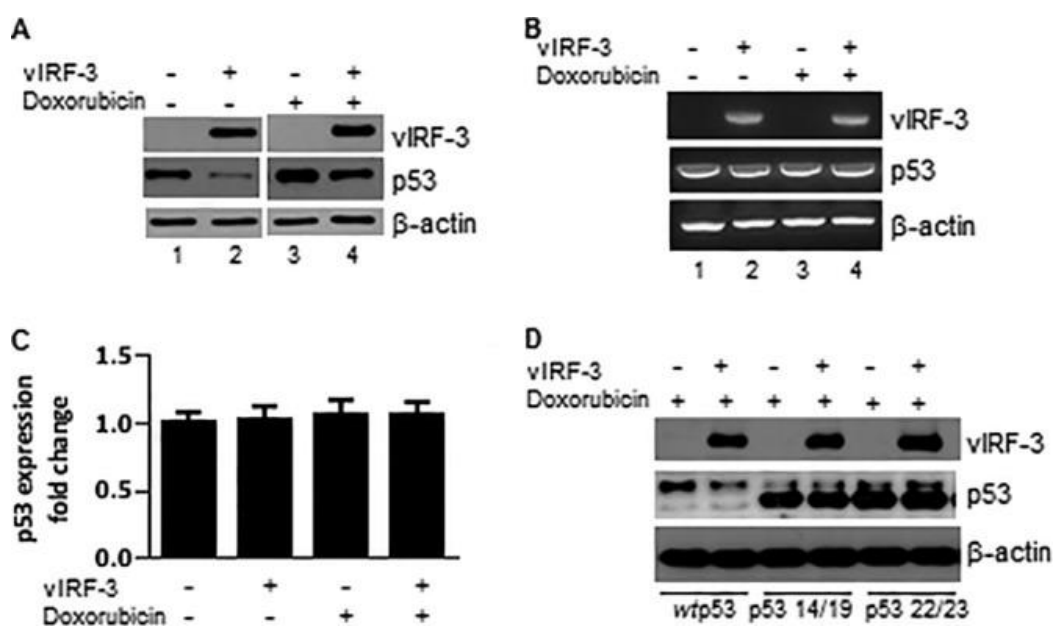


## 4.3. vIRF3 a p53

### 4.3.1. vIRF3 negativně reguluje proteinovou stabilitu p53

Již dříve bylo prokázáno, že vIRF3 asociuje s p53 a inhibuje apoptózu zprostředkovanou p53 (Rivas C. *et al.*, 2001). Přesný molekulární mechanismus tohoto fenoménu však prokázán nebyl. My jsme zjistili, že vIRF3 exprimující HCT-116 buňky, nesoucí WT (wild type) p53, vykazují opakovaně nižší množství endogenního p53 proteinu ve srovnání s kontrolními HCT-116 buňkami, jež byly transfekované prázdným vektorem (pcDNA3.1). Western blotová analýza s anti-p53 (DO1) protilátkami (Obr. 11A) prokázala, že HCT-116 (wt p53<sup>+/+</sup>) buňky transfekované vIRF3 expresním plazmidem a inkubované v přítomnosti nebo bez doxorubicínu (induktor dvouřetězcových zlomů na DNA, jenž aktivuje p53), vykazovaly snížení množství endogenního p53 proteinu v buněčných lyzátech ve srovnání s kontrolními buňkami. Množství p53 proteinu bylo u buněk exprimujících vIRF3 nižší bez ohledu na působení doxorubicínu. Zjištěná redukce p53 proteinu detekovaná Western blotem nebyla zaznamenána na úrovni RNA. Výsledky získané pomocí RT-PCR (Obr. 11B) a kvantitativní RT-PCR (qRT-PCR) (Obr. 11C) prokázaly, že relativní množství p53 mRNA zůstalo konstantní ve všech testovaných vzorcích. Usoudili jsme tedy, že exprese vIRF3 vede ke snížení stability a k narušení akumulace p53 proteinu v buňkách.

E3 ubiquitin ligáza, Mdm2, cílí p53 k proteazomální degradaci (Kruse J.P. a Gu W., 2009). Pro zjištění, zda je vIRF3 zprostředkovaná deregulace p53 proteinu závislá na Mdm2, jsme zkoumali efekt vIRF3 na stabilitu dvou p53 mutantních proteinů p53(14/19) a p53(22/23), u nichž došlo k nahrazení aminokyselinových zbytků alaninem na pozicích 14/19 respektive 22/23. Oba p53 mutantní proteiny jsou rezistentní vůči Mdm2 zprostředkované degradaci (Lin J. *et al.*, 1994; Lin J. *et al.*, 2000). p53 mutantní proteiny byly exogenně exprimovány v p53 nulitních buňkách Saos2 v přítomnosti nebo bez vIRF3 (Obr. 11D). Imunoblotová analýza s anti-p53 (FL-393) protilátkami ukázala, že vIRF3 nebyl schopný redukovat množství mutovaných p53 proteinů. Vzhledem k tomu, že ke snížení množství p53 proteinu ve vIRF3 exprimujících buňkách dochází v přítomnosti wt p53 proteinu, zatímco jeho formy rezistentní vůči Mdm2 zprostředkované degradaci tento efekt nevykazují, lze usoudit, že vIRF3 může usnadňovat degradaci p53 skrze dráhu zahrnující Mdm2.

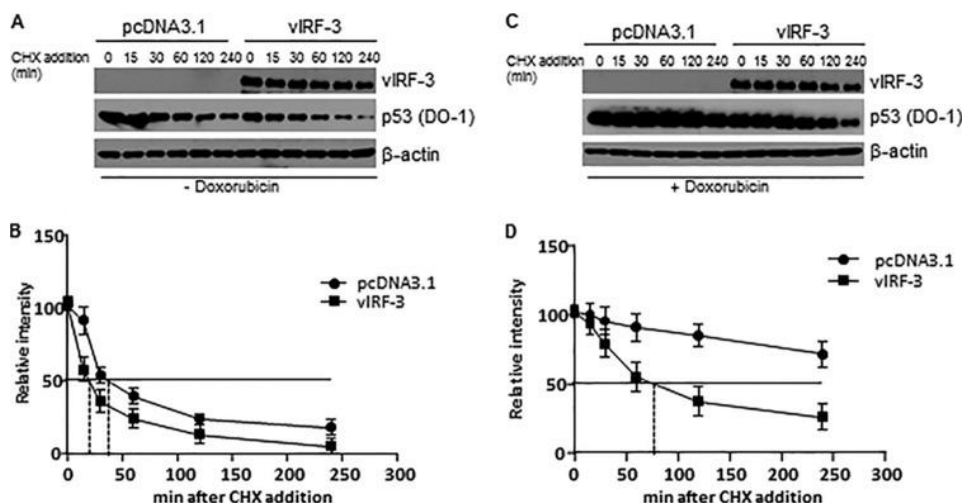


Obr. 11.: **Stabilita p53 proteinu je snížena v přítomnosti vIRF3.** A/ HCT-116 buňky exprimující vIRF3 vykazují nižší množství p53 než kontrolní buňky. HCT-116 (wt p53<sup>+/+</sup>) buňky byly transfekovány vIRF3 expresním plazmidem (sloupce 2 a 4), nebo prázdným vektorem (pcDNA3.1; sloupce 1 a 3). 24 hod po transfekci byly buňky inkubovány v přítomnosti (+), nebo bez (-) doxorubicinu (1μM) po dobu 24 hod. Celé buněčné lyzáty byly analyzovány Western blotem s anti-p53 (DO-1), anti-vIRF-3 a anti-β-aktinovými protilátkami. B/ RT-PCR. Celková RNA byla izolována z buněk, jež byly připraveny stejným způsobem, jenž je popsán výše (A). Tato RNA pak byla analyzována pomocí RT-PCR za použití primerů specifických pro vIRF3, p53 a β-aktinovou cDNA. C/ Real-time RT-PCR. p53 cDNA připravená stejným způsobem jako pro RT-PCR byla analyzována real-time RT-PCR esejí za použití specifických p53 a β-aktinových primerů. Chybové úsečky reprezentují odchylku u čtyřech nezávislých experimentů. Každý experiment byl proveden v duplikátech. D/ vIRF3 zprostředkovaná degradace je Mdm2 závislá. Saos2 (p53 nulitní) buňky byly transfekovány vIRF3 expresním plazmidem, nebo prázdným vektorem spolu s plazmidy exprimujícími wt p53 nebo p53 mutantní proteiny - p53(14/19) a p53(22/23). Buňky pak byly vystaveny působení doxorubicinu (1μM) po dobu 24 hod a buněčné lyzáty byly analyzovány Western blotem s anti-p53 (FL-393), anti-vIRF3 a anti-β-aktinovými protilátkami.

#### 4.3.2. vIRF3 snižuje životnost p53

Pro zjištění, zda vIRF3 snižuje stabilitu p53 proteinu, jsme stanovovali životnost p53 u HCT-116 buněk při inhibici proteinové syntézy způsobené cykloheximidem (25 μg/ml) (Obr. 12). HCT-116 buňky transfekované vIRF3 expresním plazmidem, nebo prázdným vektorem, byly vystaveny působení cykloheximidu a množství p53 v buněčných lyzátech bylo stanoveno Western blotem. Z výsledků je patrné, že v přítomnosti vIRF dochází k výrazné destabilizaci endogenního p53 (Obr. 12A). Zatímco životnost (half-life) wt p53 proteinu u buněk transfekovaných prázdným

plazmidem byla okolo 38 min, v přítomnosti vIRF3 byl half-life p53 snížen na 20 min. Obr. 12B znázorňuje kvantifikaci několika nezávislých experimentů se stejnými výsledky. Mnohem zřetelnější efekt vIRF3 na stabilitu p53 proteinu byl zaznamenán v buňkách, jež byly vystaveny působení doxorubicinu (Obr. 12C). Stresem (doxorubicinem) vyvolaná indukce p53 prodloužila half-life p53 proteinu na více než 240 min (4 hod). Naproti tomu, v přítomnosti vIRF3, dochází k prokazatelnému snížení životnosti (half-life) p53 proteinu, a to přibližně na 78 min (1,3 hod) (Obr. 12D). Tato zjištění tak ještě více podporují myšlenku, že exprese ektopického vIRF3 efektivně snižuje stabilitu p53.

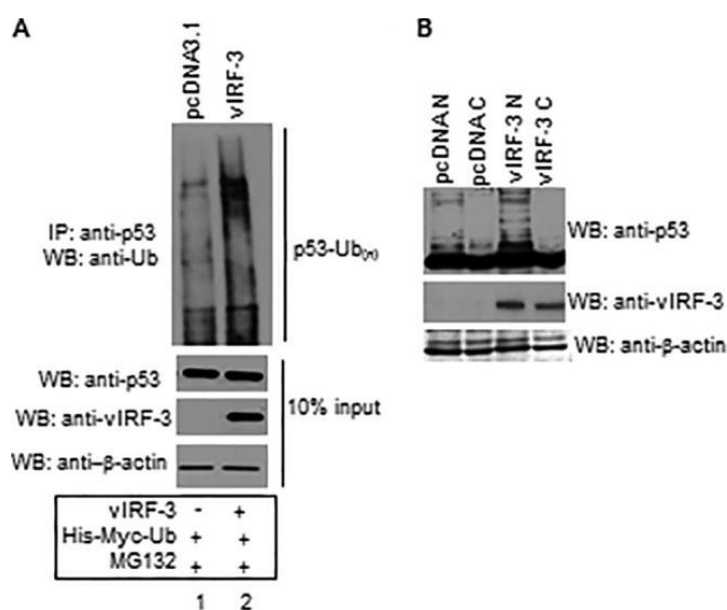


Obr. 12.: **Expres vIRF3 snižuje životnost p53.** A/ HCT-116 (wt p53<sup>+/+</sup>) buňky byly transfekovány vIRF3 expresním plazmidem, nebo prázdným vektorem (pcDNA3.1). 24 hod po transfekci byly buňky inkubovány v přítomnosti (+) (C), nebo bez (-) (A) doxorubicinu (1  $\mu$ M) po dobu 24 hod. Poté byly buňky vystaveny působení 25  $\mu$ g/ml cykloheximidu (CHX) po dobu indikovanou na obrázku. Buněčné lyzáty pak byly analyzovány pomocí Western blotu s anti-p53 (DO-1), anti-vIRF3 a anti- $\beta$ -aktinovými protilátkami. B/ a D/ Kvantifikace signálů z imunoblotu na Obr. A a C. p53 byl normalizován k signálu  $\beta$ -aktinu a poté byl vztažen vzhledem k signálu získanému v čase 0 působení cykloheximidu. Chybové úsečky reprezentují odchylku u třech nezávislých experimentů. Každý experiment byl proveden v duplikátech.

#### 4.3.3. vIRF3 zesiluje ubiquitinaci p53

Pro porozumění mechanismu, kterým vIRF3 snižuje množství p53, jsme zjišťovali ubiquitinační status p53 u buněk exprimujících vIRF3. HEK293 buňky byly ko-transfekovány konstantním množstvím plazmidu exprimujícím His-Myc tagovaný

ubiquitin (His-Myc-Ub) a vIRF3 expresním plazmidem, nebo prázdným vektorem (pcDNA3.1). 6 hod před lyzí, byly buňky inkubovány v přítomnosti proteazomálního inhibitoru MG132. p53 byl pak z buněčných lyzátů imunoprecipitován a množství ubiquitinovaného p53 v precipitátu bylo analyzováno Western blotem s anti-Ub protilátkami (Obr. 13A). I přesto, že v buňkách transfekovaných prázdným vektorem byl p53 již ubiquitinován (Obr. 13A, sloupec 1), kotransfekce s vIRF3 expresním plazmidem vedla k jasnému zesílení ubiquitinace p53 (Obr. 13A, sloupec 2). Mimoto, ve srovnání s kontrolními buňkami (BJAB/pcDNA), dochází v jádrech vIRF3 exprimujících BJAB buněk (BJAB/vIRF3) k výraznému nárůstu množství vysokomolekulárního p53 (Obr. 13B), což naznačuje, že ve vIRF3 exprimujících B buňkách je p53 silně ubiquitinován. Tyto výsledky tak prokazují, že vIRF3 destabilizuje p53 skrze jeho zvýšenou ubiquitinaci a následnou proteinovou degradaci.



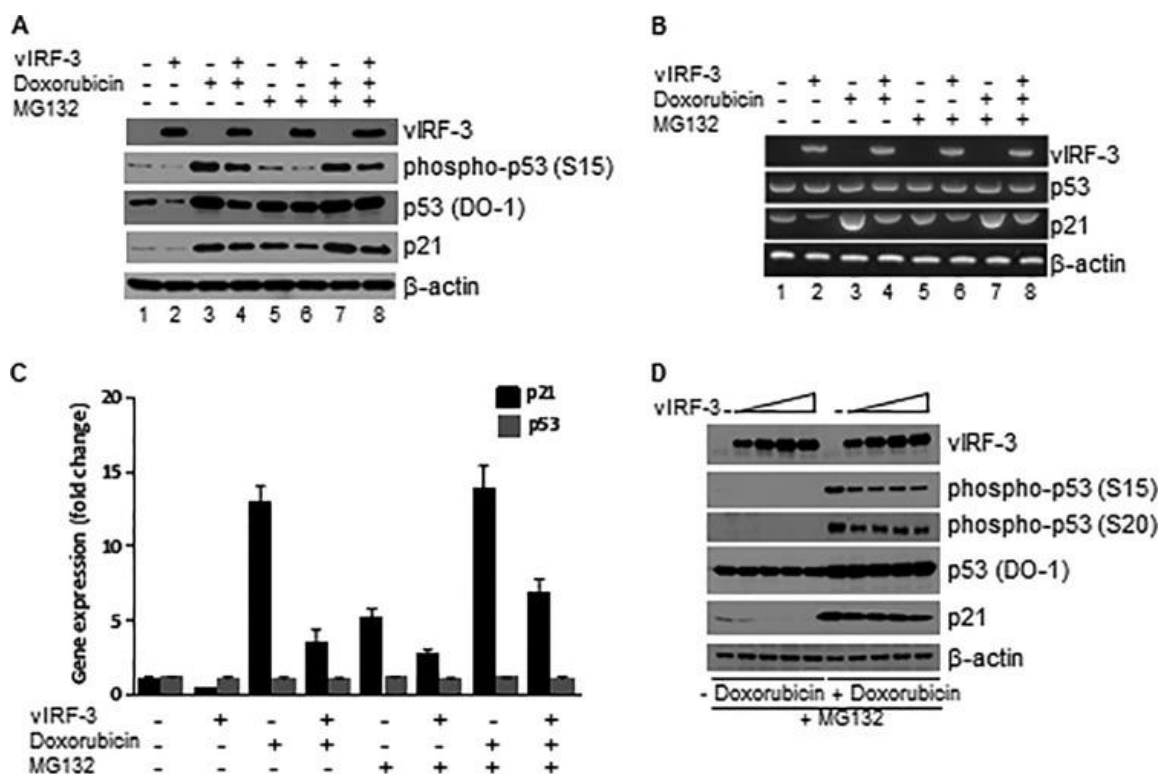
Obr. 13.: **vIRF3 zvyšuje ubiquitinaci p53.** A/ HEK293 buňky byly nejprve transfekovány stejným množstvím His-Myc-Ub a následně vIRF3 expresním plazmidem, nebo prázdným vektorem (pcDNA3.1). 6 hod před lyzí byly buňky vystaveny působení proteazomálního inhibitoru MG132 (50  $\mu$ M). p53 byl z buněčných lyzátů imunoprecipitován (IP) s anti-p53 (DO-1) specifickými protilátkami. Následoval Western blot (WB) s anti-Ub protilátkami. Relativní množství endogenního p53,  $\beta$ -aktinu a transfekovaného vIRF3 ve vstupním lyzátu (10% input) bylo stanoveno Western blotem. B/ Přítomnost vysokomolekulárního p53 v jaderných extraktech vIRF3 exprimujících buněk. Jaderné (N, nuclear) a cytoplazmatické (C) extrakty byly izolovány z BJAB/pcDNA a BJAB/vIRF3 buněk, jež byly inkubovány spolu s 50  $\mu$ M MG132 po dobu 6ti hod. vIRF3, p53 a  $\beta$ -aktin v jaderné a cytoplazmatické frakci byl analyzován Western blotem.

#### 4.3.4. vIRF3 inhibuje N-koncovou fosforylaci p53

Fosforylace p53 je jednou z mnoha posttranslačních modifikací, která hraje zásadní roli v transkripční aktivitě a v proteinové stabilitě p53 (Dai C. a Gu W., 2010). Bylo prokázáno, že N-koncová fosforylace serinových zbytků (S15/S20) redukuje afinitu p53 k jeho negativnímu regulátoru Mdm2/Hdm2 a podporuje asociaci s jeho transkripčními koaktivátory CBP/p300 (Toledo F. a Wahl G.M., 2006), což následně vede ke snížení ubiquitinace p53 a ke zvýšení jeho proteinové stability. My jsme proto analyzovali možný vliv vIRF3 na fosforylaci p53 u serinového zbytku S15. HCT-116 buňky byly transfekovány vIRF3 expresním plazmidem, nebo prázdným vektorem (pcDNA3.1) a následně byly inkubovány buď v přítomnosti, a nebo bez doxorubicinu. Množství fosforylace p53 bylo stanoveno Western blotem pomocí fosfo-specifických protilátek (Obr. 14). Přestože hladina fosforylace p53 na pozici S15 byla u neindukovných buněk nízká, ještě více byla snížena v přítomnosti vIRF3 (Obr. 14A, sloupce 1 a 2). Navíc doxorubicinem indukovaná fosforylace S15 byla snížena u buněk transfekovaných vIRF3 (Obr. 14A, sloupce 3 a 4). Pro ověření, zda k redukci fosforylace p53 nedošlo následkem snížení celkového množství p53, byly buňky 6 hod před lyzí inkubovány spolu se silným proteazomálním inhibitorem MG132. Vzhledem k tomu, že v jak kontrolních, tak ve vIRF3 exprimujících HCT-116 buňkách, bylo detekováno stejné množství p53 proteinu (Obr. 14A, sloupce 5-8), není pozorovaná redukce fosforylace serinu 15, ve vIRF3 exprimujících buňkách, zapříčiněná úbytkem množství celkového p53 proteinu. Tato data tak naznačují, že vIRF3 moduluje fosforylaci p53 na serinovém zbytku S15.

Dále jsme zjišťovali, zda toto pozorované snížení fosforylace p53 může souviset s downregulací p53 cílového genu p21<sup>cip1/waf1</sup>. Bylo prokázáno, že následkem poškození DNA, je díky působení p53, množství p21 zvýšeno a předpokládá se, že tato regulace je nedílnou součástí dráhy vedoucí k p53 zprostředkované blokaci buněčného cyklu (el-Deiry W.S., *et al.*, 1993; Xiong Y. *et al.*, 1993; Di Leonardo A. *et al.*, 1994; el-Deiry W.S. *et al.*, 1994). Ve vIRF3 exprimujících HCT-116 buňkách bylo množství p21 proteinu sníženo, což korespondovalo s intenzitou fosforylace p53 (Obr. 14A). Tato pozorovaná redukce proteinu p21 byla dále detekována na úrovni RNA za použití RT-PCR a qRT-PCR metod (Obr. 14B a C). Přestože množství p53 mRNA zůstalo konstantní, relativní množství p21 mRNA bylo prokazatelně sníženo v buňkách exprimujících vIRF3. Vystavení buněk působení doxorubicinu vedlo ke 13ti-

násobnému zvýšení transkripce p21 genu, jež byla signifikantně (3x) snížena u buněk exprimujících vIRF3. Stejné schéma pak bylo pozorováno u buněk inkubovaných s doxorubicinem a MG132.



Obr. 14: **vIRF3 zeslabuje transkripční aktivitu p53.** A/ HCT-116 (wt p53<sup>+/+</sup>) buňky transfekovány vIRF3 expresním plazmidem, nebo prázdným vektorem (pcDNA3.1) a dále byly inkubovány s doxorubicinem (1  $\mu$ M) a MG132 (50  $\mu$ M) po dobu 24, respektive 6ti hod. Poté byly buňky lyzovány a buněčné lyzáty byly analyzovány imunoblotem s anti-p53 (DO-1), anti-vIRF3, anti-phospho-p53 (S15), anti-p21 a anti- $\beta$ -aktinovými protilátkami. B/ RT-PCR. Celková RNA byla izolována z HCT-116 buněk, jež byly připraveny stejným způsobem, jenž je popsán výše (A). Tato RNA pak byla analyzována pomocí RT-PCR za použití primerů specifických pro vIRF3, p53, p21 a  $\beta$ -aktinovou cDNA. C/ Real-time RT-PCR. p53 a p21 cDNA, připravená stejným způsobem jako pro RT-PCR, byla analyzována real-time RT-PCR esejí za použití specifických p53, p21 a  $\beta$ -aktinových primerů. Chybové úsečky reprezentují odchylku u čtyřech nezávislých experimentů. Každý experiment byl proveden v duplikátech. D/ HCT-116 (wt p53<sup>+/+</sup>) byly transfekovány vzrůstajícím množstvím vIRF3 expresního plazmidu (0, 0,5, 1,5, 3 a 6  $\mu$ g) a dále byly připraveny stejným způsobem, jenž je popsán výše (A). Proteinové extrakty byly analyzovány Western blotem s anti-p53 (DO-1), anti-vIRF3, anti-phospho-p53 (S15 and S20), anti-p21 a anti- $\beta$ -aktinovými protilátkami.

Pro potvrzení zjištěných dat jsme transfekovali HCT-116 buňky vzrůstajícím množstvím vIRF3 expresního plazmidu, a poté jsme je inkubovali v přítomnosti nebo bez doxorubicinu. Pro zablokování proteazomem zprostředkované degradace p53, byly buňky po dobu 6ti hod před lyzí vystaveny působení MG132. Jak je vidět na Obr. 14D,

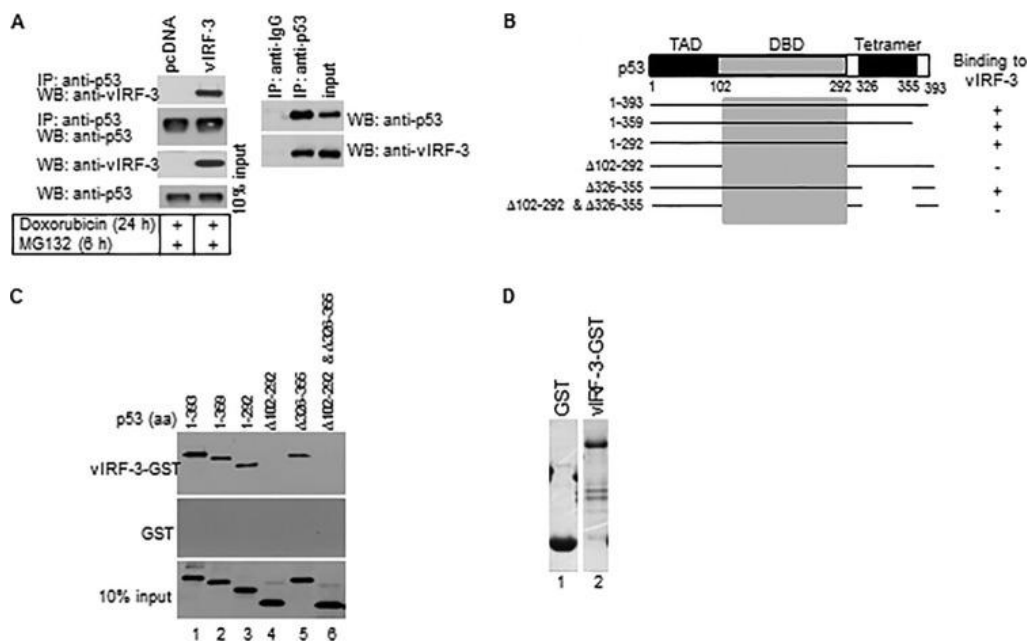
přestože množství endogenního p53 a  $\beta$ -aktinu zůstalo stabilní, hladina p53 fosforylace serinového zbytku S15, a také S20, stejně tak jako množství p21 se snižovala, a to v závislosti na množství přidaného vIRF3. V souhrnu lze tedy říci, že vIRF3 negativně reguluje S15/S20 fosforylaci p53 a následně redukuje expresi p53 cílového genu p21.

#### 4.3.5. vIRF3 interaguje s DNA-vazebnou doménou p53

Pro bližší porozumění molekulárního mechanismu, kterým vIRF3 inhibuje funkci p53, jsme analyzovali p53-vIRF3 interakci. p53 se skládá z amino (N)-koncové transaktivační domény (TAD; aminokyseliny 1-42), nesoucí vazebné místo pro Mdm2; prolin-bohaté domény (proline-rich domain, PRD; aminokyseliny 63-97); centrální DNA-vazebné domény (DNA-binding domain, DBD; aminokyseliny 100-300); tetramerizační domény (TD; aminokyseliny 307-355), nesoucí jaderný exportní signál (nuclear export signal, NES) a z karboxy (C)-koncové domény (CRD; aminokyseliny 355-393), nesoucí jaderný lokalizační signál (nuclear localization signal, NLS) (Dai C. a Gu W., 2010). Přesně Rivas *et al.* zaznamenal přímou interakci mezi vIRF3 a p53 použitím GST pulldown metody (Rivas C. *et al.*, 2001), *in vivo* asociaci mezi těmito proteiny, použitím ko-imunoprecipitačních experimentů s buněčnými lyzáty PEL, či vIRF3 a p53 transfekovaných Saos2 buněk, se jim prokázat nepodařilo. My jsme proto zkoumali, zda může být vIRF3-p53 interakce detekována ve stresu (doxorubicinem) aktivovaných buňkách. Ko-imunoprecipitace byla provedena použitím proteinových lyzátů izolovaných z HCT-116 buněk, jež byly transfekované vIRF3 expresním plazmidem, nebo prázdným vektorem (pcDNA3.1). Buňky byly inkubovány v přítomnosti doxorubicinu a MG132, díky čemuž u nich došlo k aktivaci p53 a zároveň k zablokování jeho degradace. Jak je vidět na Obr. 15, byli jsme schopni detekovat interakci mezi endogenním p53 a ektopickým vIRF3 u buněk vystavených působení doxorubicinu (Obr. 15A).

Pro mapování oblasti na p53, která je potřebná pro interakci s vIRF3, byly *in vitro* translatované p53 deleční mutanty, skládající se z jednotlivých domén p53 (Obr. 15B), použity pro *in vitro* pulldown esej s GST-tagovaným vIRF3 plné délky (full-length vIRF3; FL vIRF3) (Obr. 15C). Kvalita pročištěných rekombinantních GST a vIRF3-GST proteinů je ukázána na Obr. 15D (sloupce 1 a 2). Tato analýza ukázala, že pro interakci s vIRF3 je důležitá DNA-vazebná doména (DBD) p53 (aminokyseliny

102-292) (Obr. 15C). Žádný z p53 mutantních proteinů nebyl schopen interakce s GST kontrolou, což dokazuje specifitu interakce mezi p53 a vIRF3.



Obr. 15: **vIRF3 interaguje s DNA-vazebnou doménou (DBD) p53.** A/ Ko-immunoprecipitace vIRF3 s wt p53. HCT-116 (wt p53<sup>+/+</sup>) byly transientně transfekované vIRF3 expresním plazmidem, nebo prázdným vektorem (pcDNA3.1) a dále byly inkubovány s doxorubicinem (1  $\mu$ M) a MG132 (50  $\mu$ M) po dobu 24, respektive 6ti hod. Poté byly buňky lyzovány a buněčné lyzáty (400  $\mu$ g) byly imunoprecipitovány (IP) s anti-p53 protilátkami. Koprecipitovaný vIRF3 byl detekován Western blotem (WB) s anti-vIRF3 protilátkami. Pro srovnání je ukázáno relativní množství p53 a vIRF3 ve vstupním lyzátu (40  $\mu$ g) (10% input, vlevo). Pro zajištění specifity dat získaných imunoprecipitací, jsme provedli kontrolní (IgG) imunoprecipitaci (vpravo). B/ Schématické znázornění p53 delečních mutant. TAD, transkripční doména; DBD, DNA-vazebná doména; tetramer, tetramerizační doména. Vystínovaná oblast znázorňuje vIRF3 vazebnou oblast. C/ p53 deleční mutanty byly *in vitro* translatovány pomocí TNT T7 quick-coupled transcription/translation systému a inkubovány s vIRF3 (1-566) fúzaným s GST, nebo s GST samotným imobilizovaným na glutation-Sefarózových kuličkách. Vázané proteiny byly analyzovány Western blotem s anti-p53 (FL-393) protilátkami. 10% p53 vstupních delečně mutantních proteinů je ukázáno dole (10% input). aa, aminokyseliny (amino acids). D/ Barvení Coomassie Blue pročištěného GST vIRF3-GST pužitých při GST pulldown experimentech.

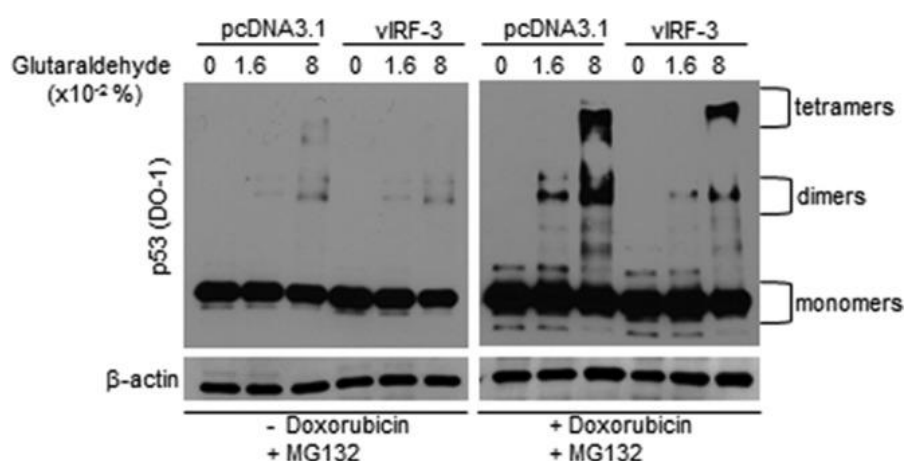
Naprostá většina (90%) mutací p53, která je spojována se vznikem nádorů, je přítomna v rámci DNA-vazebné domény p53, následkem čehož dochází ke změně konformace p53 a ke snížení jeho schopnosti se sekvenčně specificky vázat k DNA. Schopnost vIRF3 interagovat právě s touto doménou je tedy velmi zajímavá. Naše pozorování jsou však v rozporu s daty získanými Rivasem a kol. (Rivas C. *et al.*, 2001),



kteří lokalizovali vazbu vIRF3 do oblasti proteinu p53 mezi aminokyselinami 290 a 393. V jejich studii, za použití stejné GST pulldown metody, analyzovali vazbu *in vitro* translatovaného FL vIRF3 s rozdílně zkrácenými formami GST-p53. Za předpokladu, že kvalita a množství různých GST-p53 delečních mutant je v jejich publikaci srovnatelná s tou naší (v jejich publikaci to není ukázáno), může být tento rozpor zapříčiněn rozdílnou konfigurací *in vitro* translatovaných versus GST fúzovaných proteinů, která může vést ke změně jejich nativního stavu.

#### 4.3.6. Negativní vliv vIRF3 na oligomerizaci p53

Během normální homeostáze je p53 exprimován ve velmi malém množství a persistuje převážně v monomerním stavu. Pokud jsou buňky vystaveny stresu, tvoří p53 tetramery, jež mají vysokou afinitu pro vazbu k DNA (Beckerman R. a Prives C., 2010). Tetramerizace p53 je funkcí jeho C-koncové domény, zahrnující aminokyseliny 325-356. Vzhledem k tomu, že vIRF3 má negativní vliv na aktivaci/fosforylaci p53 a na expresi p21 genu, zkoumali jsme také efekt vIRF3 na oligomerizaci p53 pomocí cross-linking eseje. HCT-116 buňky byly transfekovány vIRF3 expresním plazmidem, nebo prázdným vektorem (pcDNA3.1). Pro indukci a podporu tetramerizace p53, byly inkubovány v přítomnosti doxorubicinu. Aby nedošlo k proteazomální degradaci p53, byly buňky taktéž vystaveny působení MG132. Pro vyvolání proteinového cross-linku, bylo pak k buněčným lyzátům přidáno rostoucí množství glutaraldehydu. Vzniklé p53 monomery, dimery a tetramery byly separovány pomocí SDS-PAGE a detekovány Western blotem s p53 specifickými protilátkami. Z výsledků je patrné, že vystavení buněk doxorubicinu, vedlo k výrazné indukci oligomerizace p53 (Obr. 16). Tvorba p53 dimerů mohla být detekována již při 0,016% koncentraci glutaraldehydu a tvorba tetramerů byla zaznamenána při 0,08% koncentraci glutaraldehydu. V přítomnosti vIRF3 byla schopnost tvorby dimerů a tetramerů p53 prokazatelně snížena, což indikuje, že vIRF3 může efektivně inhibovat oligomerizaci p53.



Obr. 16.: **vIRF3 inhibuje oligomerizaci wt p53 proteinu.** Oligomerizace p53 byla stanovena pomocí proteinové cross-linking eseje. HCT-116 (wt p53<sup>+/+</sup>) buňky byly transfekovány vIRF3 expresním vektorem, nebo prázdným vektorem (pcDNA 3.1). 24 hod po transfekci byly buňky inkubovány v přítomnosti (+), nebo bez (-) doxorubicinu (1  $\mu$ M) společně s MG132 (50  $\mu$ M) po dobu 24, repektive 6ti hod. Buňky byly poté lyzovány a buněčné lyzáty byly inkubovány na ledě spolu s indikovaným množstvím glutaraldehydu po dobu 10 min. Vzorky byly analyzovány Western blotem s anti-p53 (DO-1) protilátkami. Pozice monomerů, dimerů a tetramerů p53 jsou zobrazeny na obrázku.

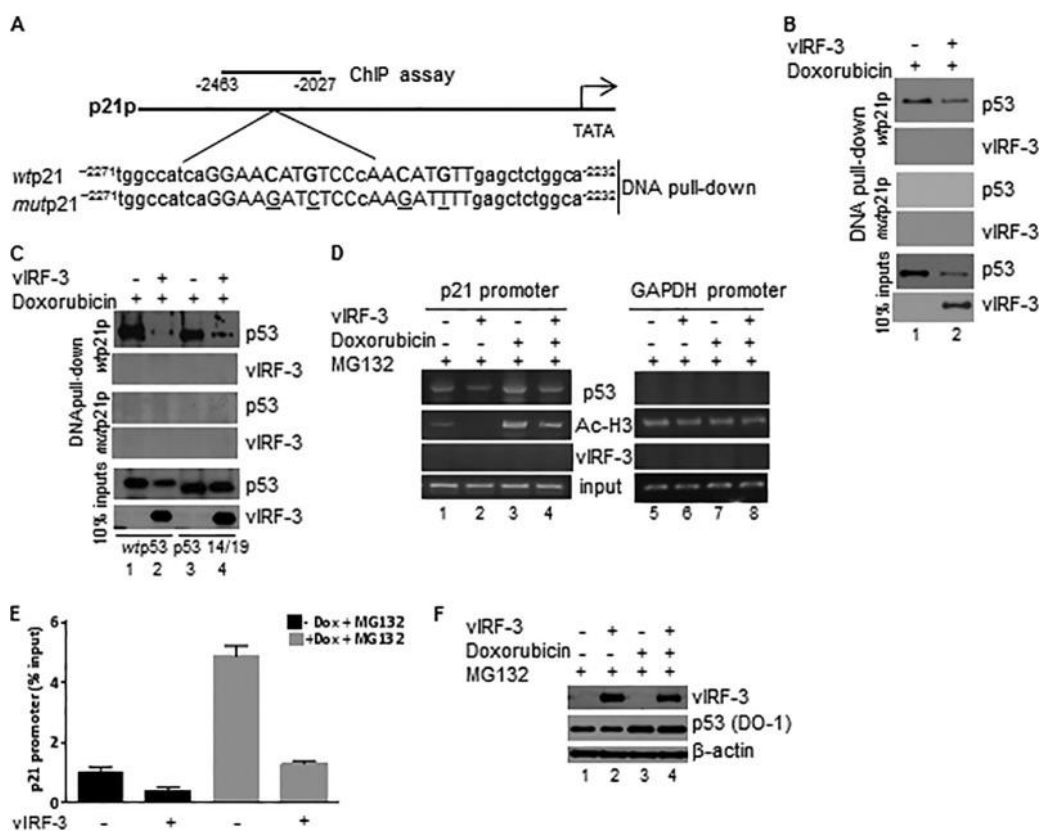
#### 4.3.7. vIRF3 inhibuje asociaci p53 s promotorovou DNA p21<sup>cip1/waf1</sup>

V předchozích experimentech jsme prokázali, že vIRF3 interaguje s DNA-vazebnou doménou p53 a inhibuje oligomerizaci p53. Zajímalo nás tedy, zda může následkem tohoto působení vIRF3, taktéž docházet k modulaci vazby p53 na jeho cílový p21 promotor. Promotor p21 obsahuje proximální a distální p53 responsivní elementy, umístěné 1,4 a 2,3 kb před iniciačním startovním místem transkripce. Oba tyto elementy se nacházejí v silně konzervované oblasti. Distální p53 vazebné místo se pak více shoduje s p53 konsenzus vazebnou sekvencí (el-Deiry W.S. *et al.*, 1993) (Obr. 17A). Pro analýzu vlivu vIRF3 na DNA vazebnou schopnost p53, jsme provedli sérii DNA pulldown analýz s oligonukleotidy odpovídajícími distálnímu p53 regulačnímu elementu (wtp21p) v p21 promotoru, nebo jeho mutované verzi (mutp21p). Biotinem opatřené oligonukleotidy, spojené se streptavidinem obalenými magnetickými kuličkami, byly inkubovány spolu s proteinovými extrakty z doxorubicinem ošetřených HCT-116 (wt p53<sup>+/+</sup>) buněk, které byly transfekovány vIRF3 expresním plazmidem, nebo prázdným vektorem (pcDNA3.1). p53 protein specificky vázaný do promotorové DNA byl detekován Western blotem. Jak je vidět na Obr. 17B, p53 se efektivně váže do promotorové sekvence p21 (Obr. 17B, sloupec 1). Exprese vIRF3 v HCT-116 (wt

p53<sup>+/+</sup>) buňkách pak vedla ke snížení vazby endogenního p53 k wt p21 oligodeoxynukleotidu (Obr. 17B, sloupec 2). Vzhledem k tomu, že k interakci s mutovanými p21 oligomery nedošlo, je vazba p53 k wt p21 specifická. Pro prokázání, že k redukci vazby p53 na p21 promotor nedošlo vlivem snížení celkového množství p53 proteinu u vIRF3 exprimujících buněk, jsme testovali DNA vazbu mutovaného p53(14/19), jenž je rezistentní vůči Mdm2 zprostředkované degradaci. Jak je vidět na Obr. 17C, vazba p53 proteinu k p21 promotoru byla v přítomnosti vIRF3 opět prokazatelně snížena. Asociace mutovaného p53(14/19) s p21 promotorovou sekvencí byla slabší než v případě wt p53 (Obr. 17C, sloupce 3 a 1), nicméně v přítomnosti ektopického vIRF3 došlo k ještě výraznějšímu snížení schopnosti vazby mutovaného p53(14/19) k DNA. Toto pozorované snížení vazebné schopnosti p53(14/19) proteinu k wt p21 oligodeoxynukleotidům tak bylo zapříčiněno vIRF3 zprostředkovanou inhibicí asociace mezi p53 a DNA.

Pro analýzu vazby p53 na p21 promotor *in vivo*, jsme použili chromatinovou imunoprecipitační esej (ChIP). Asociace endogenního p53 s endogenním p21 promotorem byla analyzována u HCT-116 buněk, které byly transfekované vIRF3 expresním plazmidem, nebo prázdným vektorem (pcDNA3.1). Pro indukci p53 a inhibici proteazomální degradace, buňky byly inkubovány s doxorubicinem (8 hod), respektive s MG132 (6 hod). Poté byly proteiny spojeny s DNA (cross-link) a DNA-proteinové komplexy byly precipitovány protilátkami proti p53, vIRF3 a acetylovanému histonu 3. DNA v precipitátech pak byla amplifikována pomocí PCR s primery lemujícími distální p53 responsivní element v p21 promotoru. Z výsledků je patrné, že u HCT-116 buněk je asociace p53 s p21 promotorem konstitutivní (Obr. 17D). Tato vazba je dále stimulována v přítomnosti doxorubicinu (Obr. 17D, sloupce 1 a 3). U buněk exprimujících ektopický vIRF3, je schopnost asociace p53 s p21 promotorem prokazatelně snížena u doxorubicinem stimulovaných i nestimulovaných buněk (Obr. 17D, sloupce 2 a 4). Kritickými regulátory p53-dependentní dráhy jsou histonacetyltransferázy CBP/p300 a PCAF. Vzhledem k tomu, že PCAF je nezbytná pro stresem indukovanou acetylaci histonu 3 (H3) v p21 promotoru a pro p53 vedenou transkripci p21 genu (Love I.M. *et al.*, 2012), zaměřili jsme se také na vliv vIRF3 na acetylaci H3. Zjistili jsme, že v buňkách exprimujících vIRF3, je ve srovnání s kontrolními buňkami, množství acetylovaného histonu H3 výrazně sníženo, což naznačuje, že v přítomnosti vIRF3, je transkripce p21 genu blokována. Vazba p53 na

kontrolní GAPDH promotor prokázána nebyla (Obr. 17D, vpravo), což potvrzuje specifitu vazby p53 k endogennímu p21 promotoru.



Obr. 17.: **vIRF3 narušuje vazbu p53 na p21 promotor.** A/ Schématické znázornění wt a mutantních oligonukleotidů a p21 primerů na p21 promotorové sekvenci, které byly použity pro DNA pulldown a ChIP analýzy. Nukleotidové zbytky odpovídající p53 konsenzus sekvenci jsou označeny velkými písmeny; invariantní C/G báze jsou označeny tučně; mutované nukleotidy v p53 vazebném místě jsou podtrženy. B/ Asociace p53 s p21 promotorem byla analyzována pomocí DNA pulldown esejí v HCT-116 buňkách. p53 proteiny vázané na DNA, byly identifikovány Western blotem s anti-p53 (DO-1) specifickými protilátkami. Relativní množství endogenního p53 a transfekovaného vIRF3 ve 35  $\mu$ g buněčného extraktu bylo stanoveno Western blotem (10% input, dole). C/ Vliv vIRF3 na vazbu wt p53 a jeho mutované formy, p53(14/19), na p21 promotor byla analyzována DNA pulldown esejí u Saos2 buněk. Navázané proteiny byly identifikovány Western blotem s anti-p53 (FL-393) protilátkami. D/ *In vivo* vazba p53 a acetylovaného histonu H3 na endogenní p21 promotor byla analyzována užitím ChIP esejí v HCT-116 (wt p53<sup>+/+</sup>) buňkách. Chromatinová imunoprecipitace byla provedena s protilátkami proti p53 (DO-1), vIRF3 a acetylovanému H3 (Ac-H3). PCR byly provedeny použitím p21 specifických a kontrolních (GAPDH specifických) primerů. Pro prokázání, že ve všech vzorcích bylo použito stejné množství DNA, je na obrázku zobrazen vstupní DNA (input), která představuje výstup PCR amplifikace před imunoprecipitací. Každý experiment byl proveden třikrát se stejnými výsledky. E/ Vyhodnocení vazby p53 na p21 pomocí kvantitativní PCR. Chromatinová imunoprecipitace a DNA izolace byla provedena způsobem uvedeným výše (D). Data byla normalizována vzhledem k vstupu z chromatinové imunoprecipitace. F/ Pro stanovení množství exprimovaného vIRF3 a p53 byly celkové buněčné extrakty, použité pro ChIP popsanou výše (D), analyzovány Western blotem. Dole je ukázáno množství  $\beta$ -aktinu, jenž byl použit jako kontrola.

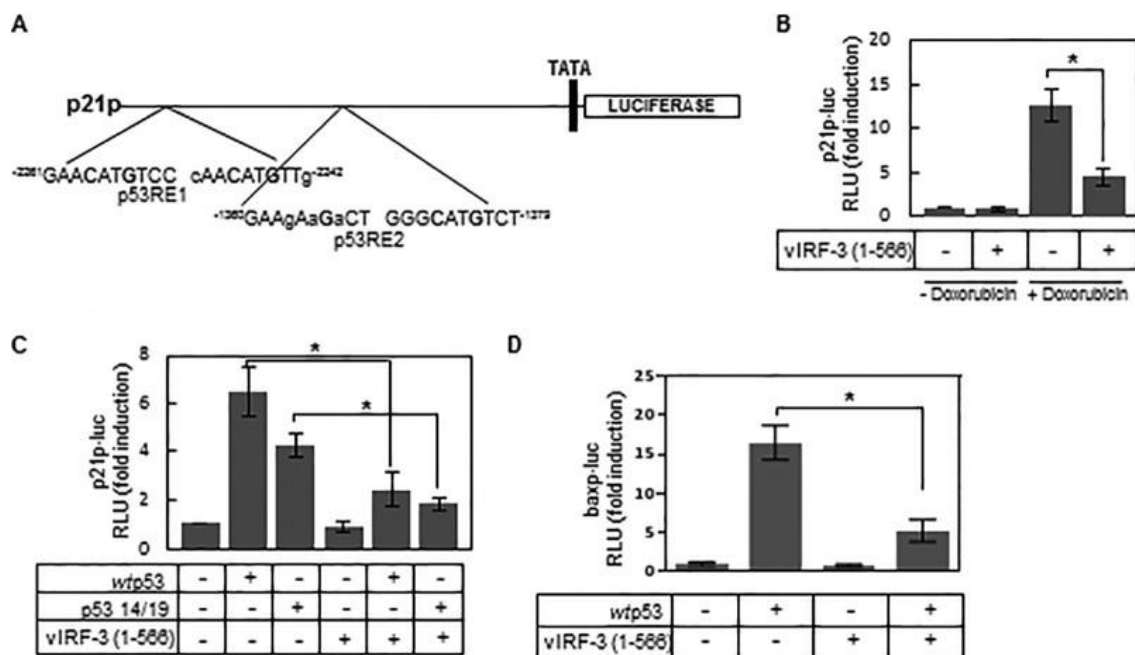
Pro zajištění přesnosti měření množství precipitované DNA jsme provedli kvantitativní PCR (Obr. 17E). Množství cílové DNA precipitované pomocí anti-p53 protilátek je vyjádřeno jako procentní podíl vstupní cílové DNA (input). Ve srovnání s HCT-116 buňkami s prázdným vektorem, exprese vIRF3 snížila množství precipitované p21 promotorové DNA zhruba 3x. Inkubace HCT-116 buněk s doxorubicinem, vedla k pětinasobnému zvýšení vazby p53 na p21 promotor, což bylo inhibováno u vIRF3 exprimujících buněk. Relativní množství endogenního p53 proteinu nebylo působením vIRF3 pozměněno díky účinku proteazomálního inhibitoru MG132 (Obr. 17F). Souhrnem tato data naznačují, že vIRF3 může efektivně redukovat schopnost vazby p53 na promotorovou sekvenci p21 genu.

#### 4.3.8. vIRF3 inhibuje p53 zprostředkovanou aktivaci transkripce p21 genu

Jak již bylo zmíněno, p53 protein je známý jako hlavní regulátor p21<sup>waf1/cip1</sup> genu, jenž je inhibitorem cyklin-dependentních kináz. V odpovědi na různé stresové podněty, se p21 váže a blokuje aktivitu specifických cyklin/cyklin-dependentních kinázových komplexů, následkem čehož dojde k zastavení buněčného cyklu. Vzhledem k tomu, že vIRF3 dokáže inhibovat fosforylaci p53 a také jeho asociaci s p21 promotorem, zkoumali jsme vliv vIRF3 na p53 zprostředkovanou aktivaci promotoru p21. Použili jsme transient-transfekční esej s reportérovým plazmidem (WWP-luc), který obsahoval luciferázový gen pod kontrolou p21 promotoru, jenž zahrnoval oblast odpovídající sekvenci 2.4 kp před iniciačním startovním místem transkripce p21. Tato promotorová oblast obsahuje dvě funkční p53 vazebná místa (p53RE1 a 2) (Obr. 18A). p21 reportérový plazmid byl transfekován do HCT-116 buněk spolu s vIRF3 (1-566) expresním plazmidem, nebo prázdným vektorem (pcDNA3.1). 24 hod po transfekci, byly buňky inkubovány v přítomnosti, nebo bez doxorubicinu po dobu dalších 24 hod. Vystavení buněk působení doxorubicinu zvýšilo množství luciferázy přibližně 12x (Obr. 18B). V přítomnosti FL vIRF3 pak došlo ke snížení množství luciferázové aktivity přibližně 4x. Tyto výsledky tak naznačují, že vIRF3 je schopný efektivně snižovat doxorubicinem indukovanou aktivaci p21 promotoru. Pro další potvrzení těchto dat, jsme provedli kotransfekční experimenty v p53 nulitních Saos2 buňkách. Tyto buňky byly transfekovány p21 reportérovým plazmidem spolu s wt p53, nebo mutovaným p53(14/19), a FL vIRF3. Ektopický wt p53 aktivoval p21 reportérový

plazmid přibližně 6x (Obr. 18C), přičemž tato aktivace byla v přítomnosti vIRF3 téměř zrušena. Ve shodě s dalšími publikacemi, mutovaná varianta p53(14/19), jenž je odolná vůči Mdm2-zprostředkované proteinové degradaci (Lin J. *et al.*, 1994; Lin J. *et al.*, 2000; Love I.M. *et al.*, 2012), byla transkripčně aktivní a aktivovala p21 promotor přibližně 4x. Zajímavé pak je, že vIRF3 dokázal snížit genovou transkripci jak wt 53, tak jeho mutované verze. Tyto poznatky naznačují, že vIRF3 může dostatečně snižovat p53 zprostředkovanou aktivaci p21 promotoru a může tak přispívat k deregulaci p21 růstové-regulační funkce.

Krom aktivace p21 a indukce blokace G1/S buněčného cyklu, může p53 indukovat apoptotické dráhy (Ryan K.M *et al.*, 2001). p53 řízená indukce proteinů lokalizovaných v mitochondrii, jako jsou NOXA, PUMA a Bax, spouští uvolnění cytochromu c a aktivuje apoptózu. Pro potvrzení širokého vlivu vIRF3 na transkripční aktivitu p53, jsme analyzovali p53 zprostředkovanou aktivaci bax genu v přítomnosti vIRF3. Promotorová oblast bax genu (od 486 do 448 pb) obsahuje čtyři motivy s homologií k p53 konsenzus vazebnému místu (Miyashita T. a Reed J.C., 1995). Pro stanovení promotorové aktivity bax genu v přítomnosti vIRF3, jsme transfekovali Saos2 buňky bax luciferázovým reportérovým konstruktem, jenž obsahoval luciferázový gen pod kontrolou bax promotoru (od 715 do 317 pb) (Cianfrocca R. *et al.*, 2008) spolu s wt p53 a/nebo FL vIRF3. Ektopický wt p53 aktivoval bax reporter přibližně 16x (Obr. 18D), zatímco v přítomnosti vIRF3 byla tato aktivace prokazatelně snížena (5x). Tato data přispívají k poznatku, že vIRF3 může cílit široké spektrum p53 cílových genů a následně deregulovat buněčný cyklus či proapoptotické dráhy.



Obr. 18: **vIRF3 inhibuje aktivaci p53 zprostředkované transkripce p21 a bax genů.** A/ Schématické znázornění wt p21 (p21p) reportérového konstruktů. p21 promotor obsahuje dvě potenciální p53 vazebná místa, p53RE1 a p53RE2. Nukleotidové zbytky značící p53 konsenzus sekvenci (RRRCATGYYYRRRCATGYYY) jsou označeny velkými písmeny; invariantní C/G báze jsou označeny tučně. B/ Vliv vIRF3 (1-566) na aktivaci p21 promotoru (p21p). Lidský wt p21p reportérový konstrukt (WPP-luc) a *Renilla* luciferázový plazmid (pRL-SV40) byly kotransfekovány do HCT-116 (wt p53<sup>+/+</sup>) buněk spolu s vIRF3 (1-566) expresním plazmidem, nebo prázdným vektorem (pcDNA 3.1). 24hod po transfekci byly buňky inkubovány v přítomnosti (+), nebo bez (-) doxorubicinu (1  $\mu$ M) po dobu dalších 24 hod. Luciferázová aktivita byla analyzována jako násobek aktivace vztažené k bazálnímu množství reportérového genu v přítomnosti kontrolního vektoru (pcDNA3.1). Výsledky byly normalizovány vzhledem k *Renilla* luciferázové aktivitě. Výsledky byly stanoveny jako průměr  $\pm$  směrodatné odchylky u tří nezávislých experimentů (\*,  $P < 0,05$ ). RLU, relativní množství luciferázy (relative luciferase units). C/ Vliv vIRF3 (1-566) na wt p53, nebo p53(14/19) zprostředkovanou aktivaci p21 promotoru. Lidský wt p21p reportér (WPP-luc), pRL-SV40 a vIRF3 (1-566) expresní plazmidy byly kotransfekovány do p53 nulitních Saos2 buněk stejným způsobem, jenž byl popsán výše (B). Luciferázová aktivita byla analyzována stejným způsobem, jenž je popsán výše (B). D/ Vliv vIRF3 (1-566) na wt p53 řízenou aktivaci promotoru bax genu (baxp). Lidský wt baxp reportérový konstrukt (baxp-Luc) a p53 a vIRF3 (1-566) expresní plazmidy byly kotransfekovány do p53 nulitních Saos2 buněk. Luciferázová aktivita byla analyzována stejným způsobem, jenž je popsán výše (B). Tyto výsledky byly stanoveny jako průměr  $\pm$  směrodatné odchylky u tří nezávislých experimentů (\*,  $P < 0,05$ ).

#### 4.3.9. vIRF3 cílí p53 regulační dráhy u KSHV-pozitivních PEL buněk

Pro potvrzení, že výše pozorovaný fenomén má biologické opodstatnění a vyskytuje se taktéž v přirozeném prostředí, jsme analyzovali vliv vIRF3 na signalizaci p53 u KSHV-pozitivní PEL buněčné linie BC-3. I přes to, že mutace, nebo delece p53 jsou velmi běžnou záležitostí u většiny maligních nádorů (Hollstein M. *et al.*, 1991), v

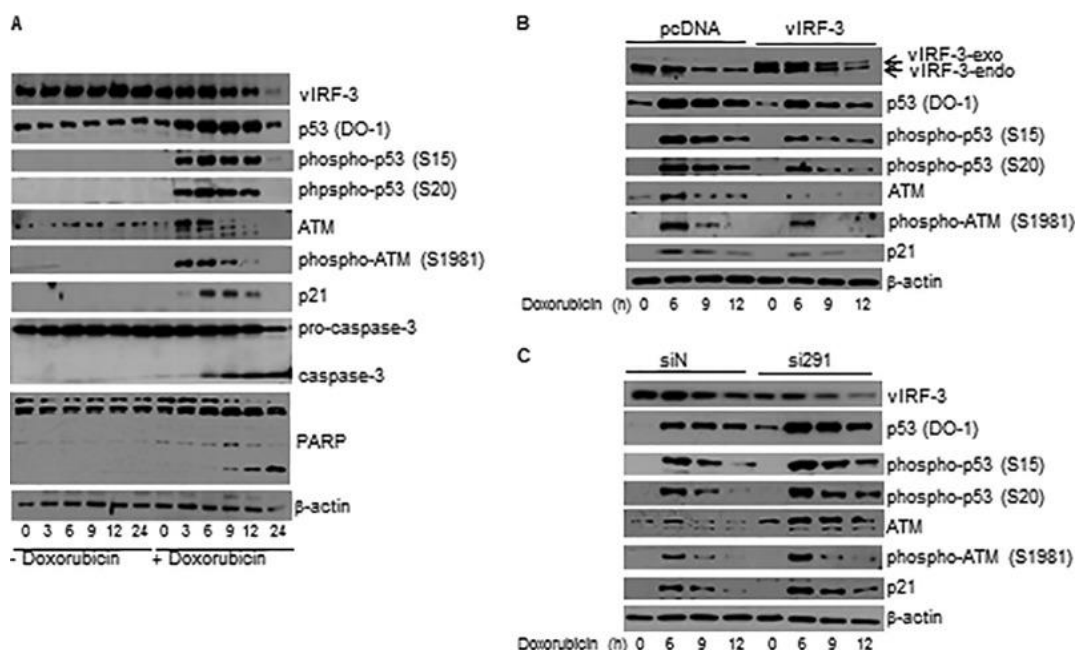
případě KSHV indukovaných PEL buněk je p53 přítomen v nezměněné formě (wt p53) (Dumaz N. a Meek D.W., 1999; Katano H. *et al.*, 2001). Pro zjištění odpovědi PEL buněk na poškození DNA, jsme nejprve testovali vliv doxorubicinu na aktivaci p53 a indukci exprese jeho cílových genů. Vystavení BC-3 buněk působení doxorubicinu po dobu 24 hod vedlo k výrazné aktivaci a akumulaci proteinu p53 (Obr. 19A). Nejvyšší množství akumulace p53 a fosforylace na S15 a S20 bylo zaznamenáno po 6ti hodinové inkubaci buněk s doxorubicinem. Indukce aktivity p53 byla v souladu s transkripční aktivací inhibitoru cyklin-dependentních kináz p21, jehož exprese taktéž vrcholila 6 hod po přidání doxorubicinu. Při delším časovém intervalu, aktivace p53 a transkripce p21 genu ustává a buňky podléhají apoptóze. Hladina aktivace kaspázy 3 a štěpení PARP proteinu dosahuje maxima okolo 24 hod po přidání doxorubicinu. Krom toho, 3 hod po přidání doxorubicinu, dochází k nahromadění ATM kinázy a také ke zvýšení její autofosforylace na pozici serinu S1981 (Obr. 19A). Je známo, že v odpovědi na genotoxický stres, prochází ATM kináza rapidní aktivací skrze autofosforylaci serinu S1981 (Bakkenist C.J. a Kastan M.B., 2003). Aktivovaná ATM pak fosforyluje p53 na pozici S15 a Mdm2 na pozici S395 (Caspari T., 2000). Tyto modifikace pak vedou ke stabilizaci a aktivaci p53.

Pro zjištění vlivu nadprodukce vIRF3 na aktivaci p53 dráhy v PEL buňkách, jsme transfekovali BC-3 buňky vIRF3 expresním plazmidem, nebo prázdným vektorem (pcDNA3.1) a následně jsme buňky vystavili působení doxorubicinu po dobu 0, 6, 9 a 12 hod (Obr. 19B). Jak jsme předpokládali, množství proteinu p53 a hladina jeho S15/S20 fosforylace byla v porovnání s kontrolními buňkami u vIRF3 exprimujících buněk redukována. Krom toho, nadprodukce vIRF3 vedla ke snížení množství ATM proteinu a také ke snížení hladiny jeho autofosforylace serinu S1981. Výrazná deregulace p53 signalizace byla dále doplněna redukcí množství proteinu p21 (Obr. 19B).

Opačný efekt měl pak knock-down exprese vIRF3, jehož jsme dosáhli užitím RNA interference (RNAi) (Obr. 19C). BC-3 buňky byly transfekovány vIRF3 specifickou siRNA (si291), nebo nesmyslnou siRNA (nonsense siRNA; siN). Specifita a efektivita vIRF3 knock-downu pomocí si291 byla prokázána výše (Obr. 4A). 2 dny po transfekci byly buňky vystaveny působení doxorubicinu po dobu 0, 6, 9 a 12 hod. Množství vIRF3 proteinu bylo, ve srovnání s kontrolními buňkami, u buněk transfekovaných si291 sníženo přibližně o 70% (Obr. 19C). Množství aktinu zůstalo stejné u všech testovaných vzorků. Toto výrazné snížení množství vIRF3 proteinu bylo



asociováno se zvýšením množství p53 a ATM proteinu, stejně tak jako se vzrůstem hladiny fosforylace p53 (S15/S20) a autofosforylace ATM (S395), či s vyšší expresí p21 (Obr. 19C). Společně pak všechna tato získaná data potvrzují, že vIRF3 zřetelně moduluje funkci p53 u KSHV asociovaného primárního efuzního lymfomu (PEL).



Obr. 19: vIRF3 inhibuje p53 regulační dráhu u KSHV pozitivních BC-3 buněk. A/ Inkubace buněk s doxorubicinem vede k aktivaci p53 regulační dráhy u KSHV-pozitivních buněk. BC-3 (wt p53) buňky byly, nebo nebyly vysatveny působení doxorubicinu (1 μM) po indikovanou dobu. Buněčné lyzáty byly analyzovány Western blotem s anti-p53 (DO-1), anti-fosfo-p53 (anti-phospho-p53; S15 a S20), anti-ATM, anti-fosfo-ATM (anti-phospho-ATM; S1981), anti p21, anti-kaspáza-3 (anti-caspase-3), anti-PARP, anti-vIRF3 a anti-β-aktinovými protilátkami. B/ Nadprodukce vIRF3 v BC-3 buňkách vede k deregulaci p53 regulační dráhy. BC-3 buňky byly transfekovány vIRF3 expresním plazmidem, nebo prázdným vektorem (pcDNA3.1). 24 hod po transfekci byly buňky inkubovány s 1 μM doxorubicinem po indikovanou dobu. Buněčné lyzáty byly analyzovány Western blotem s anti-p53 (DO-1), anti-fosfo-p53 (anti-phospho-p53; S15 a S20), anti-ATM, anti-fosfo-ATM (anti-phospho-ATM; S1981), anti p21, anti-vIRF3 a anti-β-aktinovými protilátkami. vIRF-3-endo, endogenní vIRF3; vIRF-3-exo, exogenní vIRF3. Nižší mobilita exogenního vIRF3 je následkem navázání myc tagu. C/ Knock-down exprese vIRF3 v PEL buňkách vede k aktivaci p53 dráhy. BC-3 buňky byly transfekovány vIRF3 specifickou siRNA (si291), nebo nesmyslnou siRNA (nonsense siRNA; siN). 24 hod po transfekci byly buňky inkubovány s 1 μM doxorubicinem po indikovanou dobu. Buněčné lyzáty byly analyzovány Western blotem s anti-p53 (DO-1), anti-fosfo-p53 (anti-phospho-p53; S15 a S20), anti-ATM, anti-fosfo-ATM (anti-phospho-ATM; S1981), anti p21, anti-vIRF3 a anti-β-aktinovými protilátkami. Ukázána jsou data získaná ze tří nezávislých experimentů.

## 5. Diskuze

Virová infekce je častou příčinou vzniku nádorového onemocnění u člověka. Až 15-20% incidence rakoviny je dáváno do přímé souvislosti s onkogenními viry (McLaughlin-Drubin M.E. a Munger K., 2008), které vyvinuly mnohé a často spletené strategie, jimiž deregulují důležité biologické funkce infikovaných hostitelských buněk. Buněčná transformace však zřejmě není evoluční virovou strategií, ale spíše biologickou nešťastnou náhodou, která v určitém kontextu vede ke smrti infikované buňky, a tudíž i viru. Onkogenní potenciál některých virů je následkem jejich schopnosti vytvářet latentní infekci, kdy je virový genom přímo integrován do genomu hostitelské buňky, nebo dochází k expresi virových proteinů, které rovnoměrně segregují virový genom do dceřiných buněk během dělení. Oba tyto mechanismy zajišťují, že virus není ztracen během buněčné replikace (Morales-Sánchez A. a Fuentes-Pananá E.M., 2014). Virová perzistence je charakterizována expresí proteinů kontrolujících buněčnou smrt a proliferaci, díky čemuž je zajištěna minimální možnost odhalení imunitním systémem. Častým cílem těchto virových proteinů jsou pak různé buněčné dráhy, regulující klíčové tumorsupresorové geny, aktivaci onkogenů, angiogenezi či hlavní komponenty drah signální transdukce a antigenní prezentace. Virem zprostředkovaná onkogeneze je tak následkem sledu mnoha událostí, které modulují klíčové buněčné procesy a jenž jsou vázané na životní cyklus viru.

Virus Kaposiho sarkomu kóduje několik latentních genů, k jejichž expresi dochází u všech lymfoproliferativních onemocněních (KS, PEL, MDC) asociovaných s KSHV. Jsou jimi LANA, v-FLIP, v-cyklin a Kaposin B. Krom toho, v PEL buňkách a v buňkách pocházejících z MDC, dochází k expresi vIRF3. Role těchto latentních genů v patogenezi KSHV je v současnosti studována v mnoha světových laboratořích. Progrese buněčného cyklu u buněk latentně infikovaných KSHV je vyvolána vazbou LANA na tumorsupresor Rb, následkem čehož dochází ke zvýšení exprese E2F (Radkov S.A. *et al.*, 2000) a expresí v-cyklinu, jenž se váže a aktivuje cdk6 (Swanton C. *et al.*, 1997). Apoptóza je utlumena vazbou LANA (latency associated nuclear antigen) k p53. Tato vazba pak vede kablokování schopnosti p53 působit jako transkripční aktivátor, čímž přispívá k přežití infikované buňky (Friborg J. Jr. *et al.*, 1999). Krom toho v-FLIP brání Fas-indukované programované buněčné smrti narušováním Fas/TNFR dráhy (Bélanger C. *et al.*, 2001). Přežití infikovaných buněk je navíc podporováno v-FLIP zprostředkovanou aktivací NFκB (Field N. *et al.*, 2003).

*c-myc* je protoonkogen kontrolující proliferaci, buněčný cyklus a přežití buněk (Grandori C. *et al.*, 2000). Tento protein hraje důležitou roli při vývoji B-buněčných lymfomů (Barrios C. *et al.*, 1994; Keller U.B. *et al.*, 2007). Nadprodukce *c-myc*, jako následek reciproké translokace, byla pozorována u Epstein-Barr virus pozitivních B-buněčných lymfomů (Battey J. *et al.*, 1983). U mnoha buněčných linií pocházejících z Burkittova lymfomu pak byla amplifikace *c-myc* doprovázena jeho stabilizací díky mutaci na pozici Thr-48 (Gregory M. A. a Hann S. R., 2000). Přestože u KSHV-asociovaných PEL buněčných linií doposud nebyla zaznamenána mutovaná forma *c-myc* (Arvanitakis L. *et al.*, 1996; Gaidano G. *et al.*, 1996; Carbone A. *et al.*, 1998), je zde stále jasnější důkaz toho, že je c-Myc důležitým buněčným faktorem při vývoji KSHV asociované neoplázie. KSHV latentní lokus prokazatelně spolupracuje s c-Myc při vývoji lymfomů *in vivo* u Myc/latency transgenních myší (Sin S.H. *et al.*, 2015). LANA pak stabilizuje a aktivuje c-Myc kontrolou jeho fosforylace na threoninu 58 a serinu 62 (Bubman D. *et al.*, 2007; Liu J. *et al.*, 2007). Velký význam c-Myc je navíc podpořen jeho nezbytností pro udržení latence KSHV (Li X. *et al.*, 2010). Díky těmto poznatkům je pak zřejmé, že existují mnohé mechanismy, kterými KSHV kódované latentní geny cílí a ovlivňují funkci c-Myc.

V naší práci jsme navázali na studii týkající se vIRF3 zprostředkované stimulace transkripční aktivity c-Myc, kterou publikovali v roce 2007 Lubyová B. a kol. (Lubyová B. *et al.*, 2007). Prokázali jsme, že vIRF3 může stabilizovat c-Myc protein a prodloužit jeho životnost (half-life) přibližně 4x. Vzhledem k tomu, že za rychlou degradaci c-Myc zodpovídá F-box protein Skp2, testovali jsme, zda vIRF3 interaguje s Skp2. I přes to, že byl vIRF3 schopný asociovat s Skp2, nevedla tato interakce k narušení tvorby heterodimeru c-Myc/Skp2. V přítomnosti vIRF3 naopak docházelo ke stimulaci ubiquitinace c-Myc. Studium zaměřené na přítomnost domén zahrnutých při tvorbě vIRF3/c-Myc/Skp2 interakce odhalilo, že se vIRF3 váže do F-box oblasti Skp2, jenž je podle všeho potřebná pro regulaci ubiquitinace a stability c-Myc (Kim S.Y. *et al.*, 2003). Dalším zajímavým aspektem vIRF3/c-Myc/Skp2 interakce je způsob, jakým c-Myc interaguje s vIRF3. Prokázali jsme, že vazba vIRF3 vyžaduje přítomnost dvou oblastí na c-Myc: 1/ AMK 128-143 v N-koncové oblasti, přičemž tato oblast odpovídá konzervované doméně Myc box II (MBII) a 2/ AMK 379-418 v C-koncové části proteinu. Obě tyto vIRF3 vazebné oblasti c-Myc jsou pak nezbytné pro c-Myc/Skp2 interakci (Kim S.Y. *et al.*, 2003). Kromě toho, C-koncová oblast vIRF3 (aminokyseliny 346-455), je nezbytná pro vazbu jak c-Myc, tak Skp2. Dohromady tyto výsledky

naznačují, že vIRF3 působí jako spojka, jenž pomáhá přiblížení c-Myc k jeho transkripčnímu koaktivátoru Skp2 a usnadňuje tak iniciaci c-Myc zprostředkované transkripce. V souladu s tímto předpokladem jsme prokázali, že vIRF3 může stimulovat c-Myc regulovanou transkripci vedenou z *cdk4* promotoru, přičemž tato stimulace je ještě více zesílena v přítomnosti Skp2. Aktivita *cdk4* promotoru je obrazem přítomnosti transkripčních faktorů a kofaktorů v této oblasti. Již dříve byla pomocí chromatinové imunoprecipitace (ChIP) prokázána přítomnost vIRF3-c-Myc komplexu na endogenním *cdk4* promotoru, jenž byla spojena se zvýšením acetylace histonu H3 (Lubyová B. *et al.*, 2007). V naší studii jsme pak pozorovali vliv exprese vIRF3, která následně vede ke zvýšení množství Skp2 a polyubiquitinaného c-Myc proteinu asociovaného s wt *cdk4* promotorem. Tato data tak podporují hypotézu spojení ubiquitinace c-Myc s jeho transkripční aktivitou (Kim S.Y. *et al.*, 2003; von der Lehr N. *et al.*, 2003). Ubiquitinace c-Myc může být navíc zvýšena v přítomnosti vIRF3. Na druhou stranu exprese vIRF3 vede ke zvýšení stability c-Myc. Jedním z možných vysvětlení tohoto paradoxu je možnost, že vIRF3 inhibuje proteazomální degradaci c-Myc v pozdější fázi dráhy vedoucí od ubiquitinace k proteazomální degradaci a tedy, že vIRF3 odděluje ubiquitinační a degradační dráhu. Takovýto mechanismus regulace byl pozorován u s rakovinou spojených mutantních forem c-Myc, které byly efektivně ubiquitinované Skp2 ligázou, ale zároveň byly rezistentní vůči proteazomální degradaci (Salghetti S.E. *et al.*, 1999; Kim S.Y. *et al.*, 2003). Jiným možným vysvětlením je skutečnost že ubiquitinace c-Myc, jenž je pod kontrolou vIRF3, může zahrnovat rozdílnou sadu lyzinových zbytků, jejichž ubiquitinace není spojena s proteazomální degradací.

V současné době je stále patrnější, že množství virů vyvinulo různé strategie, kterými využívají ubiquitin-proteazomální systém hostitelské buňky. Epstein-Barr virem kódovaný jaderný antigen 3C (nuclear antigen C3; EBNA3C) stabilizuje a aktivuje c-Myc a navádí c-Myc/Skp2 heterodimer k c-Myc dependentním promotorům (Bajaj B. G. *et al.*, 2008). Stejně tak, X protein hepatitis B viru stimuluje funkci c-Myc vazbou k Skp2, čímž inhibuje ubiquitinaci a proteazomální degradaci c-Myc (Kalra N. a Kumar V., 2005; Lee S. *et al.*, 2016). Jde tedy zřejmě o úspěšnou strategii, která pomáhá virům získat zásadní vliv při regulaci buněčného cyklu a přežití hostitelské buňky.

p53 je transkripční faktor vázající se do specifických vazebných míst v promotoru mnoha genů (např. geny pro p21, PUMA, Bax atd.), čímž aktivuje jejich

transkripci (Vogelstein B. *et al.*, 2000). Asociace virových proteinů s tumorsupresorem p53, je zřejmě běžným mechanismem vyvinutým DNA onkogenními viry, jenž jim umožňuje získat výhodu nad hostitelskými obrannými mechanismy a která vede k virem zprostředkované onkogenezi. Opičím polyomavirem SV40 (simian virus 40) kódovaný velký T-antigen, adenovirové E1B a E1A proteiny, HPV (human papillomavirus) E6, HSV (herpesvirus saimiri) ORF73 (Borah S. *et al.*, 2004) a EBV (Epstein-Barr virus) jaderný antigen 3C (EBNA3C) se váží na p53 a pozměňují jeho transkripční aktivitu a podílí se tak na změnách v regulaci buněčné proliferace (Lechner M.S. *et al.*, 1992; Steegenga W.T. *et al.*, 1996; Yi F. *et al.*, 2009). Krom toho, KSHV kóduje vIRF, které interagují s p53. Dva lytické geny (vIRF1 a vIRF4) jsou zřejmě zahrnuty v KSHV zprostředkované onkogenezi skrze modulaci funkce p53. vIRF1 se váže do DNA vazebné domény p53 a potlačuje p53 indukovanou apoptózu. vIRF1 navíc negativně reguluje funkci p53 blokováním aktivity ATM kinázy, což vede ke zvýšení ubiquitinace p53, která je pod kontrolou Mdm2 (Nakamura H. *et al.*, 2001; Seo T. *et al.*, 2001; Shin Y.C. *et al.*, 2006). vIRF4 reguluje stabilitu p53 interakcí s Mdm2 a HAUSP, následkem čehož dochází ke snížení relativního množství p53 skrze 26S proteazomální degradaci (Lee H.R. *et al.*, 2009; Lee H.R. *et al.*, 2011). Latentní gen LANA pak tvoří v jádře infikovaných buněk s p53 komplexy (Chen W. *et al.*, 2010) a indukuje tak následnou ubiquitinaci a degradaci p53 (Cai Q. L. *et al.*, 2006; Suzuki T. *et al.*, 2010). LANA navíc znatelně zvyšuje expresi Aurora A onkogenní kinázy, což vede k fosforylaci p53 na pozici serinu S215 a S315 a k následné ubiquitinaci a proteazomální degradaci p53 (Cai Q. *et al.*, 2012). Další latentní gen, v-cyklin, interaguje s Cdk9 a stimuluje Cdk9 zprostředkovanou fosforylaci p53 (Chang P.C. a Li M., 2008). Virus Kaposiho sarkomu tak vyvinul mnohé strategie, které efektivně inaktivují funkci p53 během latence i lytické replikace.

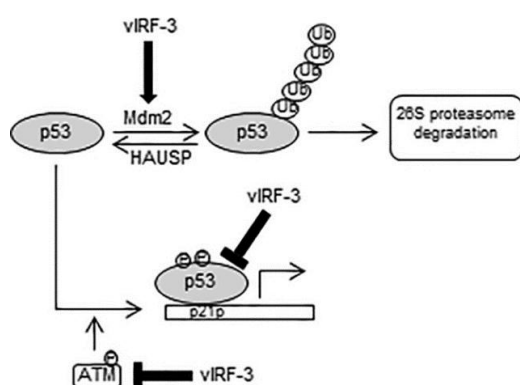
I přes to, že u většiny nádorů dochází díky mutacím ke změnám exprese p53, není u KSHV indukovaných B-buněčných lymfomů p53 modifikován. Detailní mutační analýza p53 prokázala, že všechny testované primární PEL nádory a většina PEL buněčných linií (71,4%), nesla wt p53 gen (Boulanger E. *et al.*, 2009). V naší studii jsme prokázali, že KSHV kódovaný vIRF3, může destabilizovat p53 protein a prokazatelně snížit jeho životnost (half-life) skrze indukci jeho ubiquitinace. Tento efekt je pak ještě více patrný u buněk, které byly vystaveny působení doxorubicinu. Poškození DNA, v našem případě vyvolané doxorubicinem, iniciuje kaskádu vedoucí k modifikaci p53. Fosforylace a acetylace p53 pak vede k proteinové stabilizaci p53 a ke

zvýšení jeho transkripční aktivity (Appella E. a Anderson C.W., 2001; Xu Y., 2003). Fosforylace serinů 15 a 20 (S15/S20) posiluje asociaci transkripčních koaktivátorů a acetyláz (CBP/p300, PCAF), zatímco fosforylace threoninu 18 (T18) stabilizuje p53 blokáci jeho vazby k Mdm2 (Lambert P.F. *et al.*, 1998; Sakaguchi K. *et al.*, 2000; Schon O. *et al.* 2002). S15 je považován za primární fosforylační místo, jehož modifikace předchází fosforylaci na S20 a T18 (Saito S. *et al.*, 2003). Zatímco fosforylace S15 je regulována PI3 (phosphatidylinositol 3) kinázou ATM, fosforylace S20 je zprostředkována Chk2 (checkpoint kinase 2) (Wang J. *et al.*, 2004). Krom toho, v návaznosti na poškození DNA, dochází také k rapidní fosforylaci Mdm2 ATM kinázou (Khosravi R. *et al.*, 1999). Následné studie pak odhalily, že ATM fosforyluje Mdm2 na S395 a destabilizuje jeho interakci s p53 (Maya R. *et al.*, 2001). Modifikace p53 a Mdm2 tak představují klíčové události, jež jsou zodpovědné za stabilizaci a aktivaci p53 dráhy. V naší studii jsme prokázali, že vIRF3 inhibuje fosforylaci p53 na pozici serinů S15 a S20 a to v přítomnosti i bez proteazomálního inhibitoru. Zdá se tedy, že snížená fosforylace p53, vázaná na vIRF3, vede ke stabilizaci p53-Mdm2 heterodimeru a k indukci ubiquitinace p53. Dále jsme odhalili, že množství N-koncové fosforylace p53 přímo souvisí s akumulací p53 a s p53 zprostředkovanou transkripční regulací p21. Analýza akumulace ATM proteinu a jeho autofosforylace S1981 prokázala, že množství ATM proteinu i úroveň jeho fosforylace byla efektivně zvýšena u latentně infikovaných PEL buněk po knock-downu vIRF3. Tyto výsledky tak naznačují, že vIRF3 může cílit dráhu vedoucí k ATM kináze.

Dalším poznatkem pak bylo, že vIRF3 specificky interferuje s p53 při vazbě do oblasti p21 promotoru a také, že vIRF3 narušuje tetramerizaci p53, jenž je nezbytná pro jeho funkci (Jeffrey P.D. *et al.*, 1995). Pro efektivní expresi p21 i Mdm2 musí dojít k oligomerizaci p53 (Warnock L.J. *et al.*, 2008). Pomocí DNA pulldown eseje a chromatinové imunoprecipitace se nám podařilo ukázat narušení vazby p53 k p21 promotoru v přítomnosti vIRF3. Krom toho, v buňkách exprimujících vIRF3, dochází k redukci acetylace histonu účastnícího se aktivní genové transkripce, tedy histonu H3. Proto se domníváme, že přímá interakce mezi vIRF3 a p53 maskuje DNA vazebnou doménu p53 a inhibuje jeho vazbu k promotorové DNA. Velká většina nádorových buněk nese mutaci v DNA vazebné doméně p53, jejímž následkem je pak neschopnost vazby p53 k DNA vedoucí k narušení jeho funkce. Strategie blokace schopnosti tvorby oligomerů by tak velmi účinně blokovala účinek p53. Krom toho naše zjištění, že v přítomnosti vIRF3 je narušena p53 zprostředkovaná transkripční aktivace

proapoptotického genu bax naznačuje, že exprese vIRF3 v PEL buňkách může navíc vést k deregulaci apoptotické dráhy.

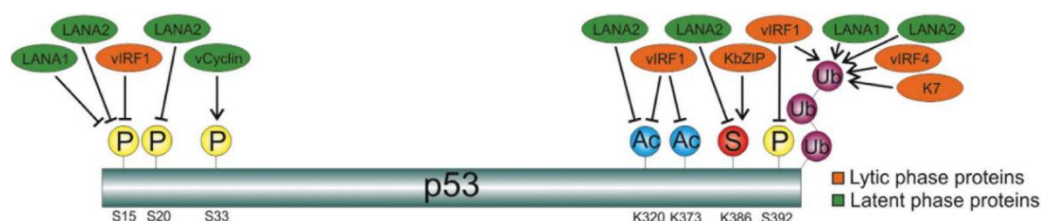
Lze tedy říci, že vIRF3 cílí funkci p53 nejméně dvěma mechanismy (Obr. 20):  
 1/ vIRF3 inhibuje regulační dráhu reprezentovanou ATM. Inhibice autofosforylace ATM a N-koncové fosforylace p53 může vést k destabilizaci p53 a ke zvýšení ubiquitinace tohoto proteinu, následkem čehož dochází jeho proteazomální degradaci.  
 2/ přímá vIRF3-p53 interakce narušuje oligomerizaci a DNA vazebnou schopnost p53, což vede ke snížené transkripční aktivitě p53 cílových genů, včetně p21.



Obr. 20.: **Model navrhnutého mechanismu, kterým vIRF3 inaktivuje p53.** Při poškození DNA dochází k fosforylaci p53 ATM (ataxia telangiectasia-mutated) kinázou a k jeho acetylaci pomocí CBP/p300, což vede k aktivaci a proteinové stabilizaci p53 (Caspari T., 2000). Polyubiquitinace p53 Mdm2 E3 ubiquitin ligázou naopak cílí p53 k 26S proteazomální degradaci (Hu W. *et al.*, 2012). vIRF3 ovlivňuje funkci pomocí následujících mechanismů: 1/ vIRF3 přímo interaguje s DBD (DNA-binding domain) p53 a inhibuje jeho oligomerizaci a také jeho vazbu k promotoru genu p21; 2/ vIRF3 inhibuje N-koncovou fosforylaci p53, což může vést ke snížení transkripční aktivity p53. Krom toho, redukce p53 a hladina fosforylace ATM mohou být přímo spojeny s Mdm2 zprostředkovanou polyubiquitinací a následnou 26S proteazomální degradací. vIRF3 exprimující buňky tak vykazují prokazatelně nižší proteinovou stabilitu a životnost p53. *Ub*, ubiquitin; *P*, fosfát (phosphorus).

Posttranslační modifikace proteinu p53 má zásadní vliv na funkci a stabilitu tohoto klíčového tumorsupresoru. Změny fosforylace a ubiquitinace p53 způsobené vIRF3, tak zásadně přispívají k zeslabení jeho transkripční aktivity a následně k deregulaci důležitých buněčných drah zahrnutých v regulaci buněčného cyklu či apoptózy. Laura M. V. *et al.* navíc v nedávné době prokázali vliv vIRF3 na sumolyaci p53, kdy vIRF3 interaguje s p53 a negativně působí na p53-SUMO2 konjugaci, následkem čehož dochází k inhibici buněčného stárnutí (senescence), které je inhibované v odpovědi na nadprodukci SUMO2, nebo působení interferonu typu I

(Laura M. V. *et al.*, 2015). Zdá se tedy, že vIRF3 spolu s některými dalšími KSHV kódovanými latentními i lytickými geny, zásadně moduluje posttranslační modifikaci proteinu p53 na mnoha úrovních a působí tak jako účinný negativní regulátor jeho aktivity (Obr. 21).



Obr. 21.: **Regulace posttranslačních modifikací p53 KSHV proteiny.** Latentní protein v-cyklin indukuje fosforylaci p53 na pozici serinu S33. Latentní proteiny LANA a vIRF3 inhibují fosforylaci p53 na pozici serinu S15 a podporují ubiquitinaci p53. vIRF3 navíc inhibuje sumolyaci p53 a jeho fosforylaci na pozici serinu S20 a acetylaci na lyzinu K320. Lytický protein vIRF1 inhibuje fosforylaci p53 na pozici serinu S15 a S392 a acetylaci na pozici lyzinu K320 a K373 a podporuje ubiquitinaci p53. vIRF4 a K7 také indukují ubiquitinaci p53. KbZIP indukuje konjugaci SUMO2 a p53. *LANA2*, (latency associated nuclear antigen 2 = vIRF3); *P*, fosfát (phosphorus); *Ac*, acetylovaný zbytek; *S*, sumolyovaný zbytek; *Ub*, ubiquitin. Převzato od (Laura M. V. *et al.*, 2015).

Metodika využívající RNA interferenci (RNAi) se stává stále více využívanou strategií v mnohých oblastech současného výzkumu. Jde o metodu, jenž využívá vnitřní buněčný systém pro utlumení exprese (knock-down) cílových genů a umožňuje tak studium různorodých molekulárních drah, jež jsou v pozadí příčiny vzniku mnohých onemocnění a biologických procesů na posttranskripční úrovni. Účinnost siRNA molekul využitých při RNAi je závislá na mnoha faktorech, zahrnujících dosažitelnost a sekundární strukturu cílové mRNA, pozici odpovídající sekvence a na vnitřní charakteristice siRNA a mRNA (Fakhr E. *et al.*, 2016). Zavedení metodiky RNAi vyžaduje optimalizaci mnoha kroků, zahrnujících navržení správné siRNA, doručení siRNA do buňky, či testování účinnosti knock-downu. Teprve pak může být zkoumán biologický dopad umlčení daného genu. V naší práci se nám podařilo identifikovat dvě vIRF3 specifické siRNA (si291 a si999), jenž po úspěšném doručení do cílových buněk redukovaly množství vIRF3 proteinu s 63-70%, respektive 41% účinností. Tyto siRNA navíc nevykazovaly žádný nespecifický efekt či vazbu k buněčným homologům cílového virového genu. Díky zvládnutí metodiky RNA interference jsme tak mohli



studovat vliv vIRF3 proteinu na expresi genů zahrnutých při regulaci kritických buněčných drah, a to v přirozeném prostředí a v kontextu celého KSHV genomu.

## 6. Závěr

V naší práci jsme si stanovili za cíl objasnění mechanismu, kterým KSHV-kódovaný vIRF3 moduluje funkci zásadního onkoproteinu c-Myc a klíčového tumorsupresoru p53. Navázali jsme na práci, v níž školitelka Mgr. Barbora Lubyová, PhD. identifikovala interakci vIRF3 s c-Myc, přičemž tato vazba vedla ke stimulaci c-Myc dependentní transkripce. Podařilo se nám prokázat, že vIRF3 stabilizuje c-Myc protein a výrazně prodlužuje jeho životnost (half-life). vIRF3 dále pomáhá vazbě c-Myc a jeho transkripčního ko-faktoru Skp2 k promotorům regulovaným c-Myc a efektivně tak zvyšuje c-Myc dependentní transkripci. Buňky, ve kterých dochází k nadprodukci vIRF3, vykazují navíc vyšší množství ubiquitinace c-Myc, jenž je zřejmě nezbytná pro c-Myc zprostředkovanou transkripci. Pro lepší porozumění mechanismu, kterým vIRF3 reguluje vazbu c-Myc a Skp2 do promotorové oblasti cílových genů, jsme identifikovali vzájemná vazebná místa jednotlivých komponent vIRF3/Skp2/c-Myc komplexu.

Krom toho se nám podařilo identifikovat účinný mechanismus, kterým vIRF3 dereguluje funkci tumorsupresoru p53. Prokázali jsme, že vIRF3 snižuje stabilitu a životnost (half-life) proteinu p53 a že jeho exprese má zásadní vliv na jeho posttranslační modifikace, tvorbu tetramerů či na jeho DNA vazebnou schopnost. Důsledkem těchto změn je pak snížení transkripce genů regulovaných p53, jako jsou p21 a Bax, což může vést k narušení regulace buněčného růstu či apoptózy.

V neposlední řadě bylo naším cílem zavedení metody RNA interference do naší laboratoře. Podařilo se nám zvládnout veškerá úskalí související s touto metodou a využít systému umlčení exprese cílového genu pro studium předpokládaného efektu vIRF3 na regulaci buněčného cyklu a přežití u buněk infikovaných KSHV.

Studium molekulárního mechanismu, kterým vIRF3 ovlivňuje funkci c-Myc a p53 tak přispívá k porozumění KSHV-asociované lymfomogeneze a naznačuje jeho klíčovou funkci při patogenezi KSHV.

## 7. Seznam použité literatury

- Abend, J. R.; Uldrick, T.; Ziegelbauer, J. M. Regulation Of Tumor Necrosis Factor-Like Weak Inducer of Apoptosis Receptor Protein (TWEAKR) Expression by Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus MicroRNA Prevents TWEAK-Induced Apoptosis and Inflammatory Cytokine Expression. *Journal of Virology* **2010**, 84 (23), 12139–12151.
- Ahlquist, P. RNA-Dependent RNA Polymerases, Viruses, And RNA Silencing. *Science* **2002**, 296 (5571), 1270–1273.
- Ahmad, A.; Groshong, J. S.; Matta, H.; Schamus, S.; Punj, V.; Robinson, L. J.; Gill, P. S.; Chaudhary, P. M. Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded Viral FLICE Inhibitory Protein (VFLIP) K13 Cooperates with Myc to Promote Lymphoma in Mice. *Cancer Biology and Therapy* **2010**, 10 (10), 1033–1040.
- Alexandrow, M. G.; Kawabata, M.; Aakre, M.; Moses, H. L. Overexpression Of the c-Myc Oncoprotein Blocks the Growth-Inhibitory Response but Is Required for the Mitogenic Effects of Transforming Growth Factor Beta 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1995**, 92 (8), 3239–3243.
- Anand, P.; Kunnumakara, A. B.; Sundaram, C.; Harikumar, K. B.; Tharakan, S. T.; Lai, O. S.; Sung, B.; Aggarwal, B. B. Cancer Is a Preventable Disease That Requires Major Lifestyle Changes. *Pharmaceutical Research* **2008**, 25 (9), 2097–2116.
- Andreoni, M.; Sarmati, L.; Nicastri, E.; El Sawaf, G.; El Zalabani, M.; Uccella, I.; Bugarini, R.; Parisi, S.G.; Rezza, G. Primary Human Herpesvirus 8 Infection In Immunocompetent Children. *Jama* **2002**, 287 (10), 1295.
- Appella, E.; Anderson, C. W. Post-Translational Modifications and Activation of p53 by Genotoxic Stresses. *European Journal of Biochemistry* **2001**, 268 (10), 2764–2772.
- Areste, C.; Mutocheluh, M.; Blackburn, D. J. Identification Of Caspase-Mediated Decay of Interferon Regulatory Factor-3, Exploited by a Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus Immunoregulatory Protein. *Journal of Biological Chemistry* **2009**, 284 (35), 23272–23285.
- Arvin, A.; Campadelli-Fiume, G.; Mocarski, E.; Moore, P. S.; Roizman, B.; Whitley, R.; Yamanishi, K. *Human Herpesviruses Biology, Therapy, And Immunoprophylaxis*; Cambridge University Press: Cambridge, 2007.
- Au, W.-C.; Yeow, W.-S.; Pitha, P. Analysis Of Functional Domains of Interferon Regulatory Factor 7 and Its Association with IRF-3. *Virology* **2001**, 280 (2), 273–282.
- Au, W. C.; Moore, P. A.; Lowther, W.; Juang, Y. T.; Pitha, P. M. Identification Of a Member of the Interferon Regulatory Factor Family That Binds to the Interferon-Stimulated Response Element and Activates Expression of Interferon-Induced Genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1995**, 92 (25), 11657–11661.
- Arvanitakis, L.; Mesri, E. A.; Nador, R. G.; Said, J. W.; Asch, A. S.; Knowles, D. M.; Cesarman, E. Establishment and characterization of a primary effusion (body cavity-based) lymphoma cell line (BC-3) harboring Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) in the absence of Epstein-Barr virus. *Blood* **1996**, 88 (7), 2648–2654.
- Bagn  ris, C.; Rogala, K. B.; Baratchian, M.; Zamfir, V.; Kunze, M. B. A.; Dagless, S.; Pirker, K. F.; Collins, M. K.; Hall, B. A.; Barrett, T. E.; et al. Probing The Solution Structure of I  B Kinase (IKK) Subunit    and Its Interaction with Kaposi Sarcoma-Associated Herpes Virus Flice-Interacting Protein and IKK Subunit    by EPR Spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry* **2015**, 290 (38), 23024–23024.
- Bais, C.; Santomaso, B.; Coso, O.; Arvanitakis, L.; Raaka, E. G.; Gutkind, J. S.; Asch, A. S.; Cesarman, E.; Gershengorn, M. C.; Mesri, E. A. Erratum: G-Protein-Coupled Receptor of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Is a Viral Oncogene and Angiogenesis Activator. *Nature* **1998**, 392 (6672), 210–210.
- Bajaj, B. G.; Murakami, M.; Cai, Q.; Verma, S. C.; Lan, K.; Robertson, E. S. Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 3C Interacts With and Enhances the Stability of the c-Myc Oncoprotein. *Journal of Virology* **2008**, 82 (8), 4082–4090.

- Bakkenist, C. J.; Kastan, M. B. DNA Damage Activates ATM through Intermolecular Autophosphorylation and Dimer Dissociation. *Nature* **2003**, *421* (6922), 499–506.
- Ballestas, M. E.; Chatis, P.A.; Kaye, K.M. Efficient Persistence Of Extrachromosomal KSHV DNA Mediated by Latency-Associated Nuclear Antigen. *Science* **1999**, *284* (5414), 641–644.
- Ballestas, M. E.; Kaye, K. M. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Latency-Associated Nuclear Antigen 1 Mediates Episome Persistence Through Cis-Acting Terminal Repeat (TR) Sequence and Specifically Binds TR DNA. *Journal of Virology* **2001**, *75* (7), 3250–3258.
- Banin, S.; Moyal, L.; Shieh, S.; Taya, Y.; Anderson, C.W.; Chessa, L.; Smorodinsky, N.I.; Prives, C.; Reiss, Y.; Shiloh, Y.; Ziv, Y. Enhanced Phosphorylation Of p53 by ATM in Response to DNA Damage. *Science* **1998**, *281* (5383), 1674–1677.
- Barbera, A. J.; Chodaparambil, J.V.; Kelley-Clarke, B.; Joukov, V.; Walter, J.C.; Luger, K.; Kaye, K.M. The Nucleosomal Surface As a Docking Station for Kaposi's Sarcoma Herpesvirus LANA. *Science* **2006**, *311* (5762), 856–861.
- Barnes, B.J.; Kellum, M.J.; Pinder, K.E.; Frisanchio, J.A.; Pitha, P.M. Interferon regulatory factor 5, a novel mediator of cell cycle arrest and cell death. *Cancer Research* **2003**, *63* (19), 6424–6431.
- Barrios, C.; Castresana, J.; Ruiz, J.; Kreicbergs, A. Amplification Of the *c-Myc* Proto-Oncogene in Soft Tissue Sarcomas. *Oncology* **1994**, *51* (1), 13–17.
- Batley, J.; Moulding, C.; Taub, R.; Murphy, W.; Stewart, T.; Potter, H.; Lenoir, G.; Leder, P. The Human *c-Myc* Oncogene: Structural Consequences of Translocation into the *Igh* Locus in Burkitt Lymphoma. *Cell* **1983**, *34* (3), 779–787.
- Beckerman, R.; Prives, C. Transcriptional Regulation By P53. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2010**, *2* (8).
- Bélanger, C.; Gravel, A.; Tomoiu, A.; Janelle, M.E.; Gosselin, J.; Tremblay, M.J.; Flamand, L. Human herpesvirus 8 viral FLICE-inhibitory protein inhibits Fas-mediated apoptosis through binding and prevention of procaspase-8 maturation. *Journal of Human Virology* **2001**, *4* (2), 62–73.
- Bellare, P.; Ganem, D. Regulation Of KSHV Lytic Switch Protein Expression by a Virus-Encoded MicroRNA: An Evolutionary Adaptation That Fine-Tunes Lytic Reactivation. *Cell Host and Microbe* **2009**, *6* (6), 570–575.
- Bernstein, E.; Caudy, A.A.; Hammond, S.M.; Hannon, G.J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **2001**, *409* (6818), 363–366.
- Bi, X.; Yang, L.; Mancl, M. E.; Barnes, B. J. Modulation Of Interferon Regulatory Factor 5 Activities by the Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded Viral Interferon Regulatory Factor 3 Contributes to Immune Evasion and Lytic Induction. *Journal of Interferon and Cytokine Research* **2011**, *31* (4), 373–382.
- Blackwood, E.; Eisenman, R. Max: a Helix-Loop-Helix Zipper Protein That Forms a Sequence-Specific DNA-Binding Complex with Myc. *Science* **1991**, *251* (4998), 1211–1217.
- Borah, S.; Verma, S. C.; Robertson, E. S. ORF73 Of Herpesvirus Saimiri, a Viral Homolog of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus, Modulates the Two Cellular Tumor Suppressor Proteins p53 and PRb. *Journal of Virology* **2004**, *78* (19), 10336–10347.
- Boshoff, C.; Endo, Y.; Collins, P.D.; Takeuchi, Y.; Reeves, J.D.; Schweickart, V.L.; Siani, M.A.; Sasaki, T.; Williams, T.J.; Gray, P.W.; Moore, P.S.; Chang, Y.; Weiss, R.A. Angiogenic And HIV-Inhibitory Functions of KSHV-Encoded Chemokines. *Science* **1997**, *278* (5336), 290–294.
- Boulanger, E.; Marchio, A.; Hong, S.-S.; Pineau, P. Mutational Analysis of TP53, PTEN, PIK3CA and CTNNB1/ -Catenin Genes in Human Herpesvirus 8-Associated Primary Effusion Lymphoma. *Haematologica* **2009**, *94* (8), 1170–1174.
- Brooks, C. L.; Li, M.; Hu, M.; Shi, Y.; Gu, W. The p53–Mdm2–HAUSP Complex Is Involved in p53 Stabilization by HAUSP. *Oncogene* **2007**, *26* (51), 7262–7266.
- Brown, H. J.; Song, M. J.; Deng, H.; Wu, T.-T.; Cheng, G.; Sun, R. NF- $\kappa$ B Inhibits Gammaherpesvirus Lytic Replication. *Journal of Virology* **2003**, *77* (15), 8532–8540.

- Brunet, A.; Bonni, A.; Zigmond, M. J.; Lin, M. Z.; Juo, P.; Hu, L. S.; Anderson, M. J.; Arden, K. C.; Blenis, J.; Greenberg, M. E. Akt Promotes Cell Survival By Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor. *Cell* **1999**, *96* (6), 857–868.
- Bubman, D.; Guasparri, I.; Cesarman, E. Deregulation Of c-Myc in Primary Effusion Lymphoma by Kaposi's Sarcoma Herpesvirus Latency-Associated Nuclear Antigen. *Oncogene* **2007**, *26* (34), 4979–4986.
- Burysek, L.; Pitha, P. M. Latently Expressed Human Herpesvirus 8-Encoded Interferon Regulatory Factor 2 Inhibits Double-Stranded RNA-Activated Protein Kinase. *Journal of Virology* **2001**, *75* (5), 2345–2352.
- Burýsek, L.; Yeow, W.S.; Lubyová, B.; Kellum, M.; Schafer, S.L.; Huang, Y.Q.; Pitha, P.M. Functional analysis of human herpesvirus 8-encoded viral interferon regulatory factor 1 and its association with cellular interferon regulatory factors and p300. *Journal of Virology* **1999**, *73* (9), 7334–7342.
- Cai, Q.-L.; Knight, J. S.; Verma, S. C.; Zald, P.; Robertson, E. S. EC5S Ubiquitin Complex Is Recruited By KSHV Latent Antigen LANA for Degradation of the VHL and p53 Tumor Suppressors. *PLoS Pathogens* **2006**, *2* (10), e116.
- Cai, Q.; Banerjee, S.; Cervini, A.; Lu, J.; Hislop, A. D.; Dzung, R.; Robertson, E. S. IRF-4-Mediated CIITA Transcription Is Blocked By KSHV Encoded LANA to Inhibit MHC II Presentation. *PLoS Pathogens* **2013**, *9* (10), e1003751.
- Cai, Q.; Xiao, B.; Si, H.; Cervini, A.; Gao, J.; Lu, J.; Upadhyay, S. K.; Verma, S. C.; Robertson, E. S. Kaposi's Sarcoma Herpesvirus Upregulates Aurora A Expression To Promote p53 Phosphorylation and Ubiquitylation. *PLoS Pathogens* **2012**, *8* (3), e1002566.
- Cai, X.; Lu, S.; Zhang, Z.; Gonzalez, C. M.; Damania, B.; Cullen, B. R. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Expresses an Array of Viral MicroRNAs in Latently Infected Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2005**, *102* (15), 5570–5575.
- Carbone, A.; Cilia, A. M.; Gloghini, A.; Capello, D.; Todesco, M.; Quattrone, S.; Volpe, R.; Gaidano, G. Establishment And Characterization of EBV-Positive and EBV-Negative Primary Effusion Lymphoma Cell Lines Harboursing Human Herpesvirus Type-8. *British Journal of Haematology* **1998**, *102* (4), 1081–1089.
- Carbone, A.; Gaidano, G. Hhv-8-Positive Body-Cavity-Based Lymphoma: A Novel Lymphoma Entity. *British Journal of Haematology* **1997**, *97* (3), 515–522.
- Caspari, T. Checkpoints: How To Activate p53. *Current Biology* **2000**, *10* (8), R315–7.
- Castanotto, D.; Rossi, J. J. The Promises and Pitfalls of RNA-Interference-Based Therapeutics. *Nature* **2009**, *457* (7228), 426–433.
- Cesarman, E.; Chang, Y.; Moore, P. S.; Said, J. W.; Knowles, D. M. Kaposi's Sarcoma–Associated Herpesvirus-Like DNA Sequences In AIDS-Related Body-Cavity–Based Lymphomas. *New England Journal of Medicine* **1995**, *332* (18), 1186–1191.
- Chandriani, S.; Ganem, D. Array-Based Transcript Profiling And Limiting-Dilution Reverse Transcription-PCR Analysis Identify Additional Latent Genes in Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. *Journal of Virology* **2010**, *84* (11), 5565–5573.
- Chang, P.-C.; Li, M. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus K-Cyclin Interacts With Cdk9 and Stimulates Cdk9-Mediated Phosphorylation of p53 Tumor Suppressor. *Journal of Virology* **2008**, *82* (1), 278–290.
- Chang, Y.; Cesarman, E.; Pessin, M.; Lee, F.; Culpepper, J.; Knowles, D.; Moore, P. Identification Of Herpesvirus-like DNA Sequences in AIDS-Associated Kaposi's Sarcoma. *Science* **1994**, *266* (5192), 1865–1869.
- Chang, Y.; Moore, P. S.; Talbot, S. J.; Boshoff, C. H.; Zarkowska, T.; Godden-Kent, D.; Paterson, H.; Weiss, R. A.; Mitnacht, S. Cyclin Encoded by KS Herpesvirus. *Nature* **1996**, *382* (6590), 410–410.
- Chen, W.; Hilton, I. B.; Staudt, M. R.; Burd, C. E.; Dittmer, D. P. Distinct p53, p53:LANA, And LANA Complexes in Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Lymphomas. *Journal of Virology* **2010**, *84* (8), 3898–3908.
- Choi, Y. B.; Nicholas, J. Bim Nuclear Translocation And Inactivation by Viral Interferon Regulatory Factor. *PLoS Pathogens* **2010**, *6* (8), e1001031.

- Choi, Y. B.; Sandford, G.; Nicholas, J. Human Herpesvirus 8 Interferon Regulatory Factor-Mediated BH3-Only Protein Inhibition Via Bid BH3-B Mimicry. *PLoS Pathogens* **2012**, *8* (6), e1002748.
- Chandriani, S.; Ganem, D. Array-based transcript profiling and limiting-dilution reverse transcription-PCR analysis identify additional latent genes in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Journal of Virology* **2010**, *84* (11), 5565-5573.
- Chudasama, P.; Konrad, A.; Jochmann, R.; Lausen, B.; Holz, P.; Naschberger, E.; Neipel, F.; Britzen-Laurent, N.; Stürzl, M. Structural Proteins of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Antagonize p53-Mediated Apoptosis. *Oncogene* **2015**, *34* (5), 639-649.
- Cianfrocca, R.; Muscolini, M.; Marzano, V.; Annibaldi, A.; Marinari, B.; Levrero, M.; Costanzo, A.; Tuosto, L. RelA/NF-KB Recruitment on the Bax Gene Promoter Antagonizes p73-Dependent Apoptosis in Costimulated T Cells. *Cell Death and Differentiation* **2008**, *15* (2), 354-363.
- Cohen, A.; Wolf, D. G.; Guttman-Yassky, E.; Sarid, R. KAPOSI'S SARCOMA-ASSOCIATED HERPESVIRUS: Clinical, Diagnostic, And Epidemiological Aspects. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* **2005**, *42* (2), 101-153.
- Corbellino, M.; Poirel, L.; Aubin, J. T.; Paulli, M.; Magrini, U.; Bestetti, G.; Galli, M.; Parravicini, C. The Role Of Human Herpesvirus 8 and Epstein-Barr Virus in the Pathogenesis of Giant Lymph Node Hyperplasia (Castleman's Disease). *Clinical Infectious Diseases* **1996**, *22* (6), 1120-1121.
- Cotter, M. A.; Robertson, E. S. The Latency-Associated Nuclear Antigen Tethers The Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Genome to Host Chromosomes in Body Cavity-Based Lymphoma Cells. *Virology* **1999**, *264* (2), 254-264.
- Cummins, J. M.; Vogelstein, B. HAUSP Is Required for p53 Destabilization. *Cell Cycle* **2004**, *3* (6), 687-690.
- Cunningham, C.; Barnard, S.; Blackbourn, D.J.; Davison, A.J. Transcription Mapping of Human Herpesvirus 8 Genes Encoding Viral Interferon Regulatory Factors. *Journal of General Virology* **2003**, *84* (6), 1471-1483.
- Dai, C.; Gu, W. p53 Post-Translational Modification: Deregulated in Tumorigenesis. *Trends in Molecular Medicine* **2010**, *16* (11), 528-536.
- Davison, A. J.; Eberle, R.; Ehlers, B.; Hayward, G. S.; Mcgeoch, D. J.; Minson, A. C.; Pellett, P. E.; Roizman, B.; Studdert, M. J.; Thiry, E. The Order Herpesvirales. *Arch Virol Archives of Virology* **2008**, *154* (1), 171-177.
- Di Leonardo, A.; Linke, S.P.; Clarkin, K.; Wahl, G.M. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes and Development* **1994**, *8* (21), 2540-2551.
- Dittmer, D.; Lagunoff, M.; Renne, R.; Staskus, K.; Haase, A.; Ganem, D. A cluster of latently expressed genes in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Journal of Virology* **1998**, *72* (10), 8309-8315.
- Dobson, M.; Ramakrishnan, G.; Ma, S.; Kaplun, L.; Balan, V.; Fridman, R.; Tzivion, G. Bimodal Regulation of FoxO3 by AKT and 14-3-3. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2011**, *1813* (8), 1453-1464.
- Dornan, D.; Shimizu, H.; Perkins, N. D.; Hupp, T. R. DNA-Dependent Acetylation of p53 by the Transcription Coactivator p300. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278* (15), 13431-13441.
- Dumaz, N.; Meek, D.W. Serine15 Phosphorylation Stimulates p53 Transactivation but Does Not Directly Influence Interaction with HDM2. *The EMBO Journal* **1999**, *18* (24), 7002-7010.
- El-Deiry, W.S.; Harper, J.W.; O'Connor, P.M.; Velculescu, V.E.; Canman, C.E.; Jackman, J.; Pietenpol, J.A.; Burrell, M.; Hill, D.E.; Wang, Y.; Wiman, K.G.; Mercer, W.E.; Kastan, M.B.; Kohn, K.W.; Elledge, S.J.; Kinzler, K.W.; Vogelstein, B. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Research* **1994**, *54* (5), 1169-1174.
- El-Deiry, W.S.; Tokino, T.; Velculescu, V.E.; Levy, D.B.; Parsons, R.; Trent, J.M.; Lin, D.; Mercer, W.E.; Kinzler, K.W.; Vogelstein, B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **1993**, *75* (4), 817-825.
- Esteban, M.; García, M.A.; Domingo-Gil, E.; Arroyo, J.; Nombela, C.; Rivas, C. The Latency Protein LANA2 from Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Inhibits Apoptosis Induced by DsRNA-Activated Protein Kinase but Not RNase L Activation. *Journal of General Virology* **2003**, *84* (6), 1463-1470.

- Fakhari, F. D.; Dittmer, D. P. Charting Latency Transcripts In Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus by Whole-Genome Real-Time Quantitative PCR. *Journal of Virology* **2002**, *76* (12), 6213–6223.
- Fakhr, E.; Zare, F.; Teimoori-Toolabi, L. Precise and efficient siRNA design: a key point in competent gene silencing. *Cancer Gene Therapy* **2016**, *23* (4), 73–82.
- Ferbeyre, G.; de Stanchina, E.; Querido, E.; Baptiste, N.; Prives, C.; Lowe, S.W. PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes and Development* **2000**, *14* (16), 2015–2027.
- Field, N.; Low, W.; Daniels, M.; Howell, S.; Daviet, L.; Boshoff, C.; Collins, M. KSHV VFLIP Binds to IKK- to Activate IKK. *Journal of Cell Science* **2003**, *116* (18), 3721–3728.
- Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M.K.; Kostas, S.A.; Driver, S.E.; Mello, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **1998**, *391* (6669), 806–811.
- Frescas, D.; Pagano, M. Deregulated Proteolysis by the F-Box Proteins SKP2 and  $\beta$ -TrCP: Tipping the Scales of Cancer. *Nature Reviews Cancer* **2008**, *8* (6), 438–449.
- Friborg, J. Jr.; Kong, W.; Hottiger, M.O.; Nabel, G.J. p53 inhibition by the LANA protein of KSHV protects against cell death. *Nature* **1999**, *402* (6764), 889–894.
- Fu, H.; Subramanian, R. R.; Masters, S. C. 14-3-3 Proteins: Structure, Function, And Regulation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **2000**, *40* (1), 617–647.
- Fujimuro, M.; Hayward, S. D. The Latency-Associated Nuclear Antigen Of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Manipulates the Activity of Glycogen Synthase Kinase-3 . *Journal of Virology* **2003**, *77* (14), 8019–8030.
- Fuld, S.; Cunningham, C.; Klucher, K.; Davison, A. J.; Blackbourn, D. J. Inhibition Of Interferon Signaling by the Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Full-Length Viral Interferon Regulatory Factor 2 Protein. *Journal of Virology* **2006**, *80* (6), 3092–3097.
- Fulmer-Smentek, S. B.; Francke, U. Association Of Acetylated Histones with Paternally Expressed Genes in the Prader-Willi Deletion Region. *Human Molecular Genetics* **2001**, *10* (6), 645–652.
- Gaidano, G.; Pastore, C.; Gloghini, A.; Volpe, G.; Ghia, P.; Saglio, G.; Carbone, A. AIDS-Related Non-Hodgkin's Lymphomas: Molecular Genetics, Viral Infection and Cytokine Deregulation. *Acta Haematologica* **1996**, *95* (3–4), 193–198.
- Gao, S.-J.; Boshoff, C.; Jayachandra, S.; Weiss, R. A.; Chang, Y.; Moore, P. S. KSHV ORF K9 (VIRF) Is an Oncogene Which Inhibits the Interferon Signaling Pathway. *Oncogene* **1997**, *15* (16), 1979–1985.
- Ghosh, S.; Karin, M. Missing Pieces In the NF-KB Puzzle. *Cell* **2002**, *109* (2), S81–96.
- Gilley, J.; Coffey, P. J.; Ham, J. FOXO Transcription Factors Directly Activate Bim Gene Expression and Promote Apoptosis in Sympathetic Neurons. *The Journal of Cell Biology* **2003**, *162* (4), 613–622.
- Gottwein, E.; Cullen, B. R. A Human Herpesvirus MicroRNA Inhibits p21 Expression And Attenuates p21-Mediated Cell Cycle Arrest. *Journal of Virology* **2010**, *84* (10), 5229–5237.
- Grandori, C.; Cowley, S. M.; James, L. P.; Eisenman, R. N. The Myc /m Ax /m Ad Network And The Transcriptional Control Of Cell Behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **2000**, *16* (1), 653–699.
- Gregory, M. A.; Hann, S. R. c-Myc Proteolysis By the Ubiquitin-Proteasome Pathway: Stabilization of c-Myc in Burkitt's Lymphoma Cells. *Molecular and Cellular Biology* **2000**, *20* (7), 2423–2435.
- Gstaiger, M.; Jordan, R.; Lim, M.; Catzavelos, C.; Mestan, J.; Slingerland, J.; Krek, W. Skp2 Is Oncogenic and Overexpressed in Human Cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, *98* (9), 5043–5048.
- Gu, W.; Roeder, R. G. Activation Of p53 Sequence-Specific DNA Binding by Acetylation of the p53 C-Terminal Domain. *Cell* **1997**, *90* (4), 595–606.
- Hann, S. R.; Eisenman, R. N. Proteins Encoded by the Human c-Myc Oncogene: Differential Expression in Neoplastic Cells. *Molecular and Cellular Biology* **1984**, *4* (11), 2486–2497.
- Harada, H.; Kitagawa, M.; Tanaka, N.; Yamamoto, H.; Harada, K.; Ishihara, M.; Taniguchi, T. Anti-Oncogenic and Oncogenic Potentials of Interferon Regulatory Factors-1 and -2. *Science* **1993**, *259* (5097), 971–974.

- Hayward, G. S. KSHV Strains: the Origins and Global Spread of the Virus. *Seminars in Cancer Biology* **1999**, 9 (3), 187–199.
- Heinzelmann, K.; Scholz, B. A.; Nowak, A.; Fossum, E.; Kremmer, E.; Haas, J.; Frank, R.; Kempkes, B. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Viral Interferon Regulatory Factor 4 (vIRF4/K10) Is a Novel Interaction Partner Of CSL/CBF1, the Major Downstream Effector of Notch Signaling. *Journal of Virology* **2010**, 84 (23), 12255–12264.
- Hermeking, H.; Funk, J. O.; Reichert, M.; Ellwart, J. W.; Eick, D. Abrogation of p53-induced cell cycle arrest by c-Myc: evidence for an inhibitor of p21WAF1/CIP1/SDI1. *Oncogene* **1995**, 11 (7), 1409–1415.
- Hermeking, H.; Rago, C.; Schuhmacher, M.; Li, Q.; Barrett, J. F.; Obaya, A. J.; O'connell, B. C.; Mateyak, M. K.; Tam, W.; Kohlhuber, F.; et al. Identification Of CDK4 as a Target of c-MYC. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2000**, 97 (5), 2229–2234.
- Hew, K.; Dahlroth, S.-L.; Venkatachalam, R.; Nasertorabi, F.; Lim, B. T.; Cornvik, T.; Nordlund, P. The Crystal Structure of the DNA-Binding Domain of VIRF-1 from the Oncogenic KSHV Reveals a Conserved Fold for DNA Binding and Reinforces Its Role as a Transcription Factor. *Nucleic Acids Research* **2013**, 41 (7), 4295–4306.
- Hirao, A.; Kong, Y.Y.; Matsuoka, S.; Wakeham, A.; Ruland, J.; Yoshida, H.; Liu, D.; Elledge, S.J.; Mak, T.W. DNA Damage-Induced Activation Of p53 by the Checkpoint Kinase Chk2. *Science* **2000**, 287 (5459), 1824–1827.
- Hollstein, M.; Sidransky, D.; Vogelstein, B.; Harris, C. p53 Mutations in Human Cancers. *Science* **1991**, 253 (5015), 49–53.
- Hu, H.; Dong, J.; Liang, D.; Gao, Z.; Bai, L.; Sun, R.; Hu, H.; Zhang, H.; Dong, Y.; Lan, K. Genome-Wide Mapping Of the Binding Sites and Structural Analysis of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Viral Interferon Regulatory Factor 2 Reveal That It Is a DNA-Binding Transcription Factor. *Journal of Virology* **2015**, 90 (3), 1158–1168.
- Hu, M.; Gu, L.; Li, M.; Jeffrey, P. D.; Gu, W.; Shi, Y. Structural Basis Of Competitive Recognition of p53 and MDM2 by HAUSP/USP7: Implications for the Regulation of the p53–MDM2 Pathway. *PLoS Biology* **2006**, 4 (2) e27.
- Hu, M.; Wang, C.; Li, W.; Lu, W.; Bai, Z.; Qin, D.; Yan, Q.; Zhu, J.; Krueger, B. J.; Renne, R.; et al. A KSHV MicroRNA Directly Targets G Protein-Coupled Receptor Kinase 2 to Promote the Migration and Invasion of Endothelial Cells by Inducing CXCR2 and Activating AKT Signaling. *PLOS Pathogens* **2015**, 11 (9) e1005171.
- Hu, W.; Feng, Z.; Levine, A. J. The Regulation Of Multiple p53 Stress Responses Is Mediated through MDM2. *Genes and Cancer* **2012**, 3 (3-4), 199–208.
- Hussain, S.; Harris, C. C. p53 Mutation Spectrum and Load: the Generation of Hypotheses Linking the Exposure of Endogenous or Exogenous Carcinogens to Human Cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **1999**, 428 (1-2), 23–32.
- Hwang, K. Y.; Choi, Y. B. Modulation Of Mitochondrial Antiviral Signaling by Human Herpesvirus 8 Interferon Regulatory Factor 1. *Journal of Virology* **2015**, 90 (1), 506–520.
- Ishov, A. M.; Sotnikov, A. G.; Negorev, D.; Vladimirova, O. V.; Neff, N.; Kamitani, T.; Yeh, E. T.; Strauss, J. F.; Maul, G. G. Pml Is Critical For Nd10 Formation and Recruits the Pml-Interacting Protein Daxx to This Nuclear Structure When Modified by Sumo-1. *The Journal of Cell Biology* **1999**, 147 (2), 221–234.
- Jacobs, S. R.; Stopford, C. M.; West, J. A.; Bennett, C. L.; Giffin, L.; Damania, B. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Viral Interferon Regulatory Factor 1 Interacts With a Member of the Interferon-Stimulated Gene 15 Pathway. *Journal of Virology* **2015**, 89 (22), 11572–11583.
- Jeffrey, P.; Gorina, S.; Pavletich, N. Crystal Structure of the Tetramerization Domain of the p53 Tumor Suppressor at 1.7 Angstroms. *Science* **1995**, 267 (5203), 1498–1502.
- Jenner, R. G.; Alba, M. M.; Boshoff, C.; Kellam, P. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Latent And Lytic Gene Expression as Revealed by DNA Arrays. *Journal of Virology* **2001**, 75 (2), 891–902.
- Jin, J.; Harper, J. A License to Kill. *Cancer Cell* **2003**, 3 (6), 517–518.
- Jones, T.; Silva, S. R. D.; Bedolla, R.; Ye, F.; Zhou, F.; Gao, S. Viral Cyclin Promotes KSHV-Induced Cellular Transformation and Tumorigenesis by Overriding Contact Inhibition. *Cell Cycle* **2014**, 13 (5), 845–858.



- Joo, C. H.; Shin, Y. C.; Gack, M.; Wu, L.; Levy, D.; Jung, J. U. Inhibition Of Interferon Regulatory Factor 7 (IRF7)-Mediated Interferon Signal Transduction by the Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Viral IRF Homolog vIRF3. *Journal of Virology* **2007**, *81* (15), 8282–8292.
- Kaiser, C.; Laux, G.; Eick, D.; Jochner, N.; Bornkamm, G.W.; Kempkes, B. The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *Journal of Virology* **1999**, *73* (5), 4481–4484.
- Kallio, P. J.; Okamoto, K.; O'Brien, S.; Carrero, P.; Makino, Y.; Tanaka, H.; Poellinger, L. Signal Transduction in Hypoxic Cells: Inducible Nuclear Translocation and Recruitment of the CBP/p300 Coactivator by the Hypoxia-Inducible Factor-1alpha. *The EMBO Journal* **1998**, *17* (22), 6573–6586.
- Kalra, N.; Kumar, V. The X Protein of Hepatitis B Virus Binds to the F Box Protein Skp2 and Inhibits the Ubiquitination and Proteasomal Degradation of c-Myc. *FEBS Letters* **2006**, *580* (2), 431–436.
- Kaplan, L. D. Human Herpesvirus-8: Kaposi Sarcoma, Multicentric Castleman Disease, and Primary Effusion Lymphoma. *Hematology* **2013**, *2013* (1), 103–108.
- Karin, M.; Lin, A. NF- $\kappa$ B at the Crossroads of Life and Death. *Nature Immunology* **2002**, *3* (3), 221–227.
- Kastan, M.B.; Onyekwere, O.; Sidransky, D.; Vogelstein, B.; Craig, R.W. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Research* **1991**, *51* (23), 6304–6311.
- Katano, H.; Sato, Y.; Sata, T. Expression Of p53 and Human Herpesvirus-8 (HHV-8)-Encoded Latency-Associated Nuclear Antigen with Inhibition of Apoptosis in HHV-8-Associated Malignancies. *Cancer* **2001**, *92* (12), 3076–3084.
- Keller, U. B.; Old, J. B.; Dorsey, F. C.; Nilsson, J. A.; Nilsson, L.; Maclean, K. H.; Chung, L.; Yang, C.; Spruck, C.; Boyd, K.; et al. Myc Targets Cks1 to Provoke the Suppression of p27Kip1, Proliferation and Lymphomagenesis. *The EMBO Journal* **2007**, *26* (10), 2562–2574.
- Khosravi, R.; Maya, R.; Gottlieb, T.; Oren, M.; Shiloh, Y.; Shkedy, D. Rapid ATM-Dependent Phosphorylation of MDM2 Precedes p53 Accumulation in Response to DNA Damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999**, *96* (26), 14973–14977.
- Kim, S. Y.; Herbst, A.; Tworkowski, K. A.; Salghetti, S. E.; Tansey, W. P. Skp2 Regulates Myc Protein Stability And Activity. *Molecular Cell* **2003**, *11* (5), 1177–1188.
- Kim, Y.; Cha, S.; Seo, T. Activation Of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway by Viral Interferon Regulatory Factor 2 of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2016**, *470* (3), 650–656.
- Kimura, Y.; Nagao, A.; Fujioka, Y.; Satou, A.; Taira, T.; Iguchi-Ariga, S.; Ariga, H. MM-1 Facilitates Degradation of c-Myc by Recruiting Proteasome and a Novel Ubiquitin E3 Ligase. *International Journal of Oncology* **2007**, *31* (4), 829–36.
- Kirchhoff, S.; Sebens, T.; Baumann, S.; Krueger, A.; Zawatzky, R.; Li-Weber, M.; Meinel, E.; Neipel, F.; Fleckenstein, B.; Krammer, P. H. Viral IFN-Regulatory Factors Inhibit Activation-Induced Cell Death Via Two Positive Regulatory IFN-Regulatory Factor 1-Dependent Domains In the CD95 Ligand Promoter. *The Journal of Immunology* **2002**, *168* (3), 1226–1234.
- Kliche, S.; Nagel, W.; Kremmer, E.; Atzler, C.; Ege, A.; Knorr, T.; Koszinowski, U.; Kolanus, W.; Haas, J. Signaling By Human Herpesvirus 8 Kaposin A through Direct Membrane Recruitment of Cytohesin-1. *Molecular Cell* **2001**, *7* (4), 833–843.
- Knights, C. D.; Catania, J.; Giovanni, S. D.; Muratoglu, S.; Perez, R.; Swartzbeck, A.; Quong, A. A.; Zhang, X.; Beerman, T.; Pestell, R. G.; et al. Distinct p53 Acetylation Cassettes Differentially Influence Gene-Expression Patterns and Cell Fate. *The Journal of Cell Biology* **2006**, *173* (4), 533–544.
- Kopan, R.; Ilagan, M. X. G. The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding The Activation Mechanism. *Cell* **2009**, *137* (2), 216–233.
- Kruse, J.-P.; Gu, W. Modes Of p53 Regulation. *Cell* **2009**, *137* (4), 609–622.
- Kruse, J.-P.; Gu, W. SnapShot: p53 Posttranslational Modifications. *Cell* **2008**, *133* (5), 930–930.e1.

- Lagos, D.; Trotter, M. W. B.; Vart, R. J.; Wang, H.-W.; Matthews, N. C.; Hansen, A.; Flore, O.; Gotch, F.; Boshoff, C. Kaposi Sarcoma Herpesvirus-Encoded VFLIP and vIRF1 Regulate Antigen Presentation in Lymphatic Endothelial Cells. *Blood* **2007**, *109* (4), 1550–1558.
- Lagunoff, M.; Ganem, D. The Structure And Coding Organization of the Genomic Termini of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (Human Herpesvirus 8). *Virology* **1997**, *236* (1), 147–154.
- Lambert, P. F.; Kashanchi, F.; Radonovich, M.F.; Shiekhata, R.; Brady, J.N. Phosphorylation Of p53 Serine 15 Increases Interaction with CBP. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273* (49), 33048–33053.
- Latres, E.; Chiarle, R.; Schulman, B. A.; Pavletich, N. P.; Pellicer, A.; Inghirami, G.; Pagano, M. Role Of the F-Box Protein Skp2 in Lymphomagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, *98* (5), 2515–2520.
- Laura, M.-V.; Cruz-Herrera, C. F. D. L.; Ferreirós, A.; Baz-Martínez, M.; Lang, V.; Vidal, A.; Muñoz-Fontela, C.; Rodríguez, M. S.; Collado, M.; Rivas, C. KSHV Latent Protein LANA2 Inhibits sumo2 Modification of p53. *Cell Cycle* **2015**, *14* (2), 277–282.
- Lechner, M.S.; Mack, D.H.; Finicle, A.B.; Crook, T.; Vousden, K.H.; Laimins, L.A. . Human papillomavirus E6 proteins bind p53 in vivo and abrogate p53-mediated repression of transcription. *EMBO Journal* **1992**, *11* (8), 3045–3052.
- Lee, B.-S.; Lee, S.-H.; Feng, P.; Chang, H.; Cho, N.-H.; Jung, J. U. Characterization Of the Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus K1 Signalosome. *Journal of Virology* **2005**, *79* (19), 12173–12184.
- Lee, H.-R.; Choi, W.-C.; Lee, S.; Hwang, J.; Hwang, E.; Guchhait, K.; Haas, J.; Toth, Z.; Jeon, Y. H.; Oh, T.-K.; et al. Bilateral Inhibition of HAUSP Deubiquitinase by a Viral Interferon Regulatory Factor Protein. *Nature Structural and Molecular Biology* **2011**, *18* (12), 1336–1344.
- Lee, H.-R.; Doganay, S.; Chung, B.; Toth, Z.; Brulois, K.; Lee, S.; Kanketayeva, Z.; Feng, P.; Ha, T.; Jung, J. U. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Viral Interferon Regulatory Factor 4 (vIRF4) Targets Expression Of Cellular IRF4 and the Myc Gene To Facilitate Lytic Replication. *Journal of Virology* **2014**, *88* (4), 2183–2194.
- Lee, H.-R.; Mitra, J.; Lee, S.; Gao, S.-J.; Oh, T.-K.; Kim, M. H.; Ha, T.; Jung, J. U. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Viral Interferon Regulatory Factor 4 (vIRF4) Perturbs The G 1 -S Cell Cycle Progression via Deregulation of the Cyclin D1 Gene. *Journal of Virology* **2015**, *90* (2), 1139–1143.
- Lee, H.-R.; Toth, Z.; Shin, Y. C.; Lee, J.-S.; Chang, H.; Gu, W.; Oh, T.-K.; Kim, M. H.; Jung, J. U. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Viral Interferon Regulatory Factor 4 Targets MDM2 To Deregulate The p53 Tumor Suppressor Pathway. *Journal of Virology* **2009**, *83* (13), 6739–6747.
- Lee, S.; Kim, W.; Ko, C.; Ryu, W.-S. Hepatitis B Virus X Protein Enhances Myc Stability by Inhibiting SCFSkp2 Ubiquitin E3 Ligase-Mediated Myc Ubiquitination and Contributes to Oncogenesis. *Oncogene* **2016**, *35* (14), 1857–1867.
- Lees-Miller, S. P.; Chen, Y. R.; Anderson, C. W. Human Cells Contain a DNA-Activated Protein Kinase That Phosphorylates Simian Virus 40 T Antigen, Mouse p53, and the Human Ku Autoantigen. *Molecular and Cellular Biology* **1990**, *10* (12), 6472–6481.
- Lehr, N. V. D.; Johansson, S.; Wu, S.; Bahram, F.; Castell, A.; Cetinkaya, C.; Hydbring, P.; Weidung, I.; Nakayama, K.; Nakayama, K. I.; et al. The F-Box Protein Skp2 Participates In c-Myc Proteasomal Degradation and Acts as a Cofactor for c-Myc-Regulated Transcription. *Molecular Cell* **2003**, *11* (5), 1189–1200.
- Lehr, N. V. D.; Johansson, S.; Larsson, L.-G. Implication Of the Ubiquitin/Proteasome System in Myc-Regulated Transcription. *Cell Cycle* **2003b**, *2* (5), 402–406.
- Lei, X.; Bai, Z.; Ye, F.; Xie, J.; Kim, C.-G.; Huang, Y.; Gao, S.-J. Regulation Of NF-KB Inhibitor IκBα and Viral Replication by a KSHV MicroRNA. *Nature Cell Biology* **2010**, *12* (2), 193–199.
- Li, M.; Brooks, C. L.; Kon, N.; Gu, W. A Dynamic Role Of HAUSP in the p53-Mdm2 Pathway. *Molecular Cell* **2004**, *13* (6), 879–886.
- Li, M.; Chen, D.; Shiloh, A.; Luo, J.; Nikolaev, A. Y.; Qin, J.; Gu, W. Deubiquitination Of p53 by HAUSP Is an Important Pathway for p53 Stabilization. *Nature* **2002**, *416* (6881), 648–653.

- Li, M.; Lee, H.; Guo, J.; Neipel, F.; Fleckenstein, B.; Ozato, K.; Jung, J.U. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral interferon regulatory factor. *Journal of Virology* **1998**, *72* (7), 5433–5440.
- Li, S.; Tan, M.; Juillard, F.; Ponnusamy, R.; Correia, B.; Simas, J. P.; Carrondo, M. A.; Mcvey, C. E.; Kaye, K. M. The Kaposi Sarcoma Herpesvirus Latency-Associated Nuclear Antigen DNA Binding Domain Dorsal Positive Electrostatic Patch Facilitates DNA Replication and Episome Persistence. *Journal of Biological Chemistry* **2015**, *290* (47), 28084–28096.
- Li, X.; Chen, S.; Feng, J.; Deng, H.; Sun, R. Myc Is Required For the Maintenance of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Latency. *Journal of Virology* **2010**, *84* (17), 8945–8948.
- Lin, C. Y.; Lovén, J.; Rahl, P. B.; Paranal, R. M.; Burge, C. B.; Bradner, J. E.; Lee, T. I.; Young, R. A. Transcriptional Amplification In Tumor Cells with Elevated c-Myc. *Cell* **2012**, *151* (1), 56–67.
- Lin, C.-W.; Tu, P.-F.; Hsiao, N.-W.; Chang, C.-Y.; Wan, L.; Lin, Y.-T.; Chang, H.-W. Identification Of a Novel Septin 4 Protein Binding to Human Herpesvirus 8 Kaposin A Protein Using a Phage Display CDNA Library. *Journal of Virological Methods* **2007**, *143* (1), 65–72.
- Lin, J.; Chen, J.; Elenbaas, B.; Levine, A. J. Several Hydrophobic Amino Acids in the p53 Amino-Terminal Domain Are Required for Transcriptional Activation, Binding to Mdm-2 and the Adenovirus 5 E1B 55-KD Protein. *Genes and Development* **1994**, *8* (10), 1235–1246.
- Lin, J.; Jin, X.; Page, C.; Sondak, V.K.; Jiang, G.; Reynolds, R.K. A modified p53 overcomes mdm2-mediated oncogenic transformation: a potential cancer therapeutic agent. *Cancer Research* **2000**, *60* (20), 5895–5901.
- Lin, R.; Genin, P.; Mamane, Y.; Sgarbanti, M.; Battistini, A.; Harrington, W. J.; Barber, G. N.; Hiscott, J. HHV-8 Encoded VIRF-1 Represses the Interferon Antiviral Response by Blocking IRF-3 Recruitment of the CBP/p300 Coactivators. *Oncogene* **2001**, *20* (7), 800–811.
- Liu, J.; Martin, H. J.; Liao, G.; Hayward, S. D. The Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus LANA Protein Stabilizes And Activates c-Myc. *Journal of Virology* **2007**, *81* (19), 10451–10459.
- Liu, Y.; Sun, R.; Lin, X.; Liang, D.; Deng, Q.; Lan, K. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded MicroRNA MiR-K12-11 Attenuates Transforming Growth Factor Beta Signaling through Suppression of SMAD5. *Journal of Virology* **2012**, *86* (3), 1372–1381.
- Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. Analysis Of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* **2001**, *25* (4), 402–408.
- Love, I. M.; Sekaric, P.; Shi, D.; Grossman, S. R.; Androphy, E. J. The Histone Acetyltransferase PCAF Regulates p21 Transcription through Stress-Induced Acetylation of Histone H3. *Cell Cycle* **2012**, *11* (13), 2458–2466.
- Lu, M.; Suen, J.; Frias, C.; Pfeiffer, R.; Tsai, M.H.; Chuang, E.; Zeichner, S.L. Dissection of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression program by using the viral DNA replication inhibitor cidofovir. *Journal of Virology* **2004**, *78* (24), 13637–13652.
- Lubyova, B.; Kellum, M. J.; Frisancho, A. J.; Pitha, P. M. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded VIRF-3 Stimulates the Transcriptional Activity of Cellular IRF-3 and IRF-7. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279* (9), 7643–7654.
- Lubyova, B.; Kellum, M. J.; Frisancho, J. A.; Pitha, P. M. Stimulation Of c-Myc Transcriptional Activity by VIRF-3 of Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282* (44), 31944–31953.
- Lubyova, B.; Pitha, P. M. Characterization Of a Novel Human Herpesvirus 8-Encoded Protein, VIRF-3, That Shows Homology to Viral and Cellular Interferon Regulatory Factors. *Journal of Virology* **2000**, *74* (17), 8194–8201.
- Lüscher, B.; Larsson, L.-G. The Basic Region/Helix – Loop – Helix/Leucine Zipper Domain of Myc Proto-Oncoproteins: Function and Regulation. *Oncogene* **1999**, *18* (19), 2955–2966.
- Maltzman, W.; Czyzyk, L. UV Irradiation Stimulates Levels of p53 Cellular Tumor Antigen in Nontransformed Mouse Cells. *Molecular and Cellular Biology* **1984**, *4* (9), 1689–1694.

- Marcos-Villar, L.; Campagna, M.; Lopitz-Otsoa, F.; Gallego, P.; Gonzalez-Santamaria, J.; Gonzalez, D.; Rodriguez, M. S.; Rivas, C. Covalent Modification by SUMO Is Required for Efficient Disruption of PML Oncogenic Domains by Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Latent Protein LANA2. *Journal of General Virology* **2011**, 92 (1), 188–194.
- Marcos-Villar, L.; Gallego, P.; Muñoz-Fontela, C.; Cruz-Herrera, C. F. D. L.; Campagna, M.; González, D.; Lopitz-Otsoa, F.; Rodríguez, M. S.; Rivas, C. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus LANA2 Protein Interacts with the Pocket Proteins and Inhibits Their Sumoylation. *Oncogene* **2013**, 33 (4), 495–503.
- Marcos-Villar, L.; Lopitz-Otsoa, F.; Gallego, P.; Muñoz-Fontela, C.; Gonzalez-Santamaria, J.; Campagna, M.; Shou-Jiang, G.; Rodriguez, M. S.; Rivas, C. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Protein LANA2 Disrupts PML Oncogenic Domains And Inhibits PML-Mediated Transcriptional Repression of the Survivin Gene. *Journal of Virology* **2009**, 83 (17), 8849–8858.
- Maul, G. G.; Negorev, D.; Bell, P.; Ishov, A. M. Review: Properties And Assembly Mechanisms of ND10, PML Bodies, or PODs. *Journal of Structural Biology* **2000**, 129 (2-3), 278–287.
- Maya, R.; Balass, M.; Kim, S.T.; Shkedy, D.; Leal, J.F.; Shifman, O.; Moas, M.; Buschmann, T.; Ronai, Z.; Shiloh, Y.; Kastan, M.B.; Katzir, E.; Oren, M. ATM-Dependent Phosphorylation of Mdm2 on Serine 395: Role in p53 Activation by DNA Damage. *Genes and Development* **2001**, 15 (9), 1067–1077.
- Mccormick, C.; Ganem, D. Phosphorylation And Function of the Kaposin B Direct Repeats of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. *Journal of Virology* **2006**, 80 (12), 6165–6170.
- Mclaughlin-Drubin, M. E.; Munger, K. Viruses Associated with Human Cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **2008**, 1782 (3), 127–150.
- Mclure, K. G.; Lee, P.W. How p53 Binds DNA as a Tetramer. *The EMBO Journal* **1998**, 17 (12), 3342–3350.
- Meulmeester, E.; Pereg, Y.; Shiloh, Y.; Jochemsen, A. G. ATM-Mediated Phosphorylations Inhibit Mdmx/Mdm2 Stabilization By HAUSP in Favor of p53 Activation. *Cell Cycle* **2005**, 4 (9), 1166–1170.
- Minhas, V.; Wood, C. Epidemiology And Transmission of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. *Viruses* **2014**, 6 (11), 4178–4194.
- Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **1995**, 80, 293–299.
- Mocarski, E. S.; Roizman, B. Structure And Role of the Herpes Simplex Virus DNA Termini in Inversion, Circularization and Generation of Virion DNA. *Cell* **1982**, 31 (1), 89–97.
- Molden, J.; Chang, Y.; You, Y.; Moore, P. S.; Goldsmith, M. A. A Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded Cytokine Homolog (VIL-6) Activates Signaling through the Shared gp130 Receptor Subunit. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, 272 (31), 19625–19631.
- Moore, P. S.; Chang, Y. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded Oncogenes And Oncogenesis. *JNCI Monographs* **1998**, 1998 (23), 65–71.
- Morales-Sánchez, A.; Fuentes-Pananá, E. Human Viruses And Cancer. *Viruses* **2014**, 6 (10), 4047–4079.
- Mori, K.; Maeda, Y.; Kitaura, H.; Taira, T.; Iguchi-Ariga, S. M. M.; Ariga, H. MM-1, a Novel c-Myc-Associating Protein That Represses Transcriptional Activity of c-Myc. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, 273 (45), 29794–29800.
- Moustakas, A.; Pardali, K.; Gaal, A.; Heldin, C.-H. Mechanisms Of TGF- $\beta$  Signaling in Regulation of Cell Growth and Differentiation. *Immunology Letters* **2002**, 82 (1-2), 85–91.
- Munoz-Fontela, C.; Marcos-Villar, L.; Hernandez, F.; Gallego, P.; Rodriguez, E.; Arroyo, J.; Gao, S.-J.; Avila, J.; Rivas, C. Induction Of Paclitaxel Resistance by the Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Latent Protein LANA2. *Journal of Virology* **2008**, 82 (3), 1518–1525.
- Munoz-Fontela, C.; Marcos-Villar, L.; Gallego, P.; Arroyo, J.; Costa, M. D.; Pomeranz, K. M.; Lam, E. W.-F.; Rivas, C. Latent Protein LANA2 From Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Interacts with 14-3-3 Proteins and Inhibits FOXO3a Transcription Factor. *Journal of Virology* **2007**, 81 (3), 1511–1516.

- Muralidhar, S.; Veytsmann, G.; Chandran, B.; Ablashi, D.; Doniger, J.; Rosenthal, L. J. Characterization Of the Human Herpesvirus 8 (Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus) Oncogene, Kaposin (ORF K12). *Journal of Clinical Virology* **2000**, *16* (3), 203–213.
- Mutocheluh, M.; Hindle, L.; Areste, C.; Chanas, S. A.; Butler, L. M.; Lowry, K.; Shah, K.; Evans, D. J.; Blackbourn, D. J. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Viral Interferon Regulatory Factor-2 Inhibits Type 1 Interferon Signalling by Targeting Interferon-Stimulated Gene Factor-3. *Journal of General Virology* **2011**, *92* (10), 2394–2398.
- Myoung, J.; Ganem, D. Generation Of a Doxycycline-Inducible KSHV Producer Cell Line of Endothelial Origin: Maintenance of Tight Latency with Efficient Reactivation upon Induction. *Journal of Virological Methods* **2011**, *174* (1-2), 12–21.
- Nachmani, D.; Stern-Ginossar, N.; Sarid, R.; Mandelboim, O. Diverse Herpesvirus MicroRNAs Target The Stress-Induced Immune Ligand MICB to Escape Recognition by Natural Killer Cells. *Cell Host and Microbe* **2009**, *5* (4), 376–385.
- Nakamura, H.; Li, M.; Zarycki, J.; Jung, J. U. Inhibition Of p53 Tumor Suppressor by Viral Interferon Regulatory Factor. *Journal of Virology* **2001**, *75* (16), 7572–7582.
- Nie, Z.; Hu, G.; Wei, G.; Cui, K.; Yamane, A.; Resch, W.; Wang, R.; Green, D. R.; Tessarollo, L.; Casellas, R.; et al. c-Myc Is a Universal Amplifier Of Expressed Genes in Lymphocytes and Embryonic Stem Cells. *Cell* **2012**, *151* (1), 68–79.
- Nixon, D. E.; Mcvoy, M. A. Terminally Repeated Sequences On a Herpesvirus Genome Are Deleted Following Circularization but Are Reconstituted by Duplication during Cleavage and Packaging of Concatemeric DNA. *Journal of Virology* **2002**, *76* (4), 2009–2013.
- Offermann, M. K. Kaposi Sarcoma Herpesvirus-Encoded Interferon Regulator Factors. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **2007**; 312:185-209.
- Ozato, K.; Tailor, P.; Kubota, T. The Interferon Regulatory Factor Family In Host Defense: Mechanism of Action. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282* (28), 20065–20069.
- Paudel, N.; Sadagopan, S.; Chakraborty, S.; Sarek, G.; Ojala, P. M.; Chandran, B. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Latency-Associated Nuclear Antigen Interacts With Multifunctional Angiogenin To Utilize Its Antiapoptotic Functions. *Journal of Virology* **2012**, *86* (11), 5974–5991.
- Paun, A.; Reinert, J. T.; Jiang, Z.; Medin, C.; Balkhi, M. Y.; Fitzgerald, K. A.; Pitha, P. M. Functional Characterization Of Murine Interferon Regulatory Factor 5 (IRF-5) and Its Role in the Innate Antiviral Response. *Journal of Biological Chemistry* **2008**, *283* (21), 14295–14308.
- Paun, A.; Pitha, P. The IRF Family, Revisited. *Biochimie* **2007**, *89* (6-7), 744–753.
- Plaisance-Bonstaff, K.; Choi, H.; Beals, T.; Krueger, B.; Boss, I.; Gay, L.; Haecker, I.; Hu, J.; Renne, R. KSHV MiRNAs Decrease Expression of Lytic Genes in Latently Infected PEL and Endothelial Cells by Targeting Host Transcription Factors. *Viruses* **2014**, *6* (10), 4005–4023.
- Poon, G. M.; Brokx, R. D.; Sung, M.; Gariépy, J. Tandem Dimerization Of the Human p53 Tetramerization Domain Stabilizes a Primary Dimer Intermediate and Dramatically Enhances Its Oligomeric Stability. *Journal of Molecular Biology* **2007**, *365* (4), 1217–1231.
- Prendergast, G.; Ziff, E. Methylation-Sensitive Sequence-Specific DNA Binding by the c-Myc Basic Region. *Science* **1991**, *251* (4990), 186–189.
- Quinn, S. R.; O'Neill, L. A. The Role Of MicroRNAs in the Control and Mechanism of Action of IL-10. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **2014**, *380*, 145–155.
- Radkov, S.A.; Kellam, P.; Boshoff, C. The latent nuclear antigen of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus targets the retinoblastoma-E2F pathway and with the oncogene Hras transforms primary rat cells. *Nature Medicine* **2000**, *6* (10), 1121–1127.
- Ramalingam, D.; Happel, C.; Ziegelbauer, J. M. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus MicroRNAs Repress Breakpoint Cluster Region Protein Expression, Enhance Rac1 Activity, And Increase In Vitro Angiogenesis. *Journal of Virology* **2015**, *89* (8), 4249–4261.

- Reith, W.; Leibundgut-Landmann, S.; Waldburger, J.-M. Regulation Of MHC Class II Gene Expression by the Class II Transactivator. *Nature Reviews Immunology* **2005**, *5* (10), 793–806.
- Rivas, C.; Thlick, A.-E.; Parravicini, C.; Moore, P. S.; Chang, Y. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus LANA2 Is a B-Cell-Specific Latent Viral Protein That Inhibits p53. *Journal of Virology* **2001**, *75* (1), 429–438.
- Russo, J. J.; Bohenzky, R. A.; Chien, M.-C.; Chen, J.; Yan, M.; Maddalena, D.; Parry, J. P.; Peruzzi, D.; Edelman, I. S.; Chang, Y.; et al. Nucleotide Sequence of the Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus (HHV8). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1996**, *93* (25), 14862–14867.
- Ryan, K. M.; Phillips, A. C.; Vousden, K. H. Regulation And Function of the p53 Tumor Suppressor Protein. *Current Opinion in Cell Biology* **2001**, *13* (3), 332–337.
- Sadler, R.; Wu, L.; Forghani, B.; Renne, R.; Zhong, W.; Herndier, B.; Ganem, D. A complex translational program generates multiple novel proteins from the latently expressed kaposin (K12) locus of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Journal of Virology* **1999**, *73* (7), 5722–5730.
- Saito S, Yamaguchi H, Higashimoto Y, Chao C, Xu Y, Fornace AJ, Jr, Appella E, Anderson CW. Phosphorylation site interdependence of human p53 post-translational modifications in response to stress. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 37536–37544.
- Sakaguchi, K.; Herrera, J. E.; Saito, S.; Miki, T.; Bustin, M.; Vassilev, A.; Anderson, C. W.; Appella, E. DNA Damage Activates p53 through a Phosphorylation-Acetylation Cascade. *Genes and Development* **1998**, *12* (18), 2831–2841.
- Sakaguchi, K.; Saito, S.; Higashimoto, Y.; Roy, S.; Anderson, C.W.; Appella, E. Damage-Mediated Phosphorylation of Human p53 Threonine 18 through a Cascade Mediated by a Casein 1-like Kinase. Effect on Mdm2 binding. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275* (13), 9278–9283.
- Sakaguchi, K.; Sakamoto, H.; Lewis, M. S.; Anderson, C. W.; Erickson, J. W.; Appella, E.; Xie, D. Phosphorylation Of Serine 392 Stabilizes the Tetramer Formation of Tumor Suppressor Protein p53. *Biochemistry* **1997**, *36* (33), 10117–10124.
- Sakakibara, S.; Ueda, K.; Nishimura, K.; Do, E.; Ohsaki, E.; Okuno, T.; Yamanishi, K. Accumulation Of Heterochromatin Components on the Terminal Repeat Sequence of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Mediated by the Latency-Associated Nuclear Antigen. *Journal of Virology* **2004**, *78* (14), 7299–7310.
- Salghetti, S. E.; Kim, S.Y.; Tansey, W.P. Destruction Of Myc by Ubiquitin-Mediated Proteolysis: Cancer-Associated and Transforming Mutations Stabilize Myc. *The EMBO Journal* **1999**, *18* (3), 717–726.
- Samols, M. A.; Hu, J.; Skalsky, R. L.; Renne, R. Cloning And Identification of a MicroRNA Cluster within the Latency-Associated Region of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. *Journal of Virology* **2005**, *79* (14), 9301–9305.
- Sarid, R.; Flore, O.; Bohenzky, R.A.; Chang, Y.; Moore, P.S. Transcription mapping of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genome in a body cavity-based lymphoma cell line (BC-1). *Journal of Virology* **1998**, *72* (2), 1005–12.
- Savitsky, D.; Tamura, T.; Yanai, H.; Taniguchi, T. Regulation Of Immunity and Oncogenesis by the IRF Transcription Factor Family. *Cancer Immunology, Immunotherapy* **2010**, *59* (4), 489–510.
- Schmidt, K.; Wies, E.; Neipel, F. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Viral Interferon Regulatory Factor 3 Inhibits Gamma Interferon And Major Histocompatibility Complex Class II Expression. *Journal of Virology* **2011**, *85* (9), 4530–4537.
- Schon, O.; Friedler, A.; Bycroft, M.; Freund, S. M.; Fersht, A. R. Molecular Mechanism Of the Interaction between MDM2 and p53. *Journal of Molecular Biology* **2002**, *323* (3), 491–501.
- Seo, T.; Lee, D.; Shim, Y. S.; Angell, J. E.; Chidambaram, N. V.; Kalvakolanu, D. V.; Choe, J. Viral Interferon Regulatory Factor 1 Of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Interacts with a Cell Death Regulator, GRIM19, and Inhibits Interferon/Retinoic Acid-Induced Cell Death. *Journal of Virology* **2002**, *76* (17), 8797–8807.
- Seo, T.; Park, J.; Choe, J. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Viral IFN Regulatory Factor 1 Inhibits Transforming Growth Factor- Signaling. *Cancer Research* **2005**, *65* (5), 1738–1747.

- Seo, T.; Park, J.; Lee, D.; Hwang, S. G.; Choe, J. Viral Interferon Regulatory Factor 1 Of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Binds to p53 and Represses p53-Dependent Transcription and Apoptosis. *Journal of Virology* **2001**, *75* (13), 6193–6198.
- Seo, T.; Park, J.; Lim, C.; Choe, J. Inhibition Of Nuclear Factor KB Activity by Viral Interferon Regulatory Factor 3 of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. *Oncogene* **2004**, *23* (36), 6146–6155.
- Shamay, M.; Krithivas, A.; Zhang, J.; Hayward, S. D. Recruitment Of the De Novo DNA Methyltransferase Dnmt3a by Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus LANA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103* (39), 14554–14559.
- Shieh, S.-Y.; Ikeda, M.; Taya, Y.; Prives, C. DNA Damage-Induced Phosphorylation Of p53 Alleviates Inhibition by MDM2. *Cell* **1997**, *91* (3), 325–334.
- Shin, Y. C.; Nakamura, H.; Liang, X.; Feng, P.; Chang, H.; Kowalik, T. F.; Jung, J. U. Inhibition Of the ATM/p53 Signal Transduction Pathway by Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Interferon Regulatory Factor 1. *Journal of Virology* **2006**, *80* (5), 2257–2266.
- Shin, Y. C.; Joo, C.-H.; Gack, M. U.; Lee, H.-R.; Jung, J. U. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Viral IFN Regulatory Factor 3 Stabilizes Hypoxia-Inducible Factor-1 To Induce Vascular Endothelial Growth Factor Expression. *Cancer Research* **2008**, *68* (6), 1751–1759.
- Silverman, N.; Maniatis, T. NF-KappaB Signaling Pathways in Mammalian and Insect Innate Immunity. *Genes and Development* **2001**, *15* (18), 2321–2342.
- Sin, S.-H.; Kim, Y.; Eason, A.; Dittmer, D. P. KSHV Latency Locus Cooperates With Myc to Drive Lymphoma in Mice. *PLOS Pathogens* **2015**, *11* (9), e1005135.
- Solis, M.; Goubau, D.; Romieu-Mourez, R.; Genin, P.; Civas, A.; Hiscott, J. Distinct Functions of IRF-3 and IRF-7 in IFN-Alpha Gene Regulation and Control of Anti-Tumor Activity in Primary Macrophages. *Biochemical Pharmacology* **2006**, *72* (11), 1469–1476.
- Soulier, J.; Grollet, L.; Oksenhendler, E.; Cacoub, P.; Cazals-Hatem, D.; Babinet, P.; d'Agay, M.F.; Clauvel, J.P.; Raphael, M.; Degos, L.; et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castleman's disease. *Blood* **1995**, *86* (4), 1276–80.
- Steegenga, W. T.; Laar, T. V.; Riteco, N.; Mandarino, A.; Shvarts, A.; Eb, A. J. V. D.; Jochemsen, A. G. Adenovirus E1A Proteins Inhibit Activation of Transcription by p53. *Molecular and Cellular Biology* **1996**, *16* (5), 2101–2109.
- Subramanian, R. P.; Geraghty, R. J. Herpes Simplex Virus Type 1 Mediates Fusion through a Hemifusion Intermediate by Sequential Activity of Glycoproteins D, H, L, and B. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104* (8), 2903–2908.
- Sun, Q.; Tsurimoto, T.; Juillard, F.; Li, L.; Li, S.; Vazquez, E. D. L.; Chen, S.; Kaye, K. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus LANA Recruits the DNA Polymerase Clamp Loader to Mediate Efficient Replication and Virus Persistence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2014**, *111* (32), 11816–11821.
- Sun, Z.; Jha, H. C.; Robertson, E. S. Bub1 In Complex with LANA Recruits PCNA To Regulate Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Latent Replication and DNA Translesion Synthesis. *J. Virol. Journal of Virology* **2015**, *89* (20), 10206–10218.
- Suzuki, T.; Isobe, T.; Kitagawa, M.; Ueda, K. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded LANA Positively Affects on Ubiquitylation of p53. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2010**, *403* (2), 194–197.
- Swanton, C.; Mann, D.J.; Fleckenstein, B.; Neipel, F.; Peters, G.; Jones, N. Herpes viral cyclin/Cdk6 complexes evade inhibition by CDK inhibitor proteins. *Nature* **1997**, *390* (6656), 184–187.
- Takaoka, A.; Yanai, H.; Kondo, S.; Duncan, G.; Negishi, H.; Mizutani, T.; Kano, S.-I.; Honda, K.; Ohba, Y.; Mak, T. W.; et al. Integral Role of IRF-5 in the Gene Induction Programme Activated by Toll-like Receptors. *Nature* **2005**, *434* (7030), 243–249.

- Takaoka, A.; Tamura, T.; Taniguchi, T. Interferon Regulatory Factor Family of Transcription Factors and Regulation of Oncogenesis. *Cancer Science* **2008**, *99* (3), 467–478.
- Takeuchi, O.; Hemmi, H.; Akira, S. Interferon Response Induced by Toll-like Receptor Signaling. *Journal of Endotoxin Research* **2004**, *10* (4), 252–256.
- Talbot, S.J.; Weiss, R.A.; Kellam, P.; Boshoff, C. Transcriptional analysis of human herpesvirus-8 open reading frames 71, 72, 73, K14, and 74 in a primary effusion lymphoma cell line. *Virology* **1999**, *257* (1), 84–94.
- Tamura, T.; Yanai, H.; Savitsky, D.; Taniguchi, T. The IRF Family Transcription Factors In Immunity and Oncogenesis. *Annual Review of Immunology* **2008**, *26* (1), 535–584.
- Tanimoto, K.; Makino, Y.; Pereira, T.; Poellinger, L. Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *EMBO Journal* **2000**, *19*, 4298–4309.
- Teufel, D. P.; Bycroft, M.; Fersht, A. R. Regulation By Phosphorylation of the Relative Affinities of the N-Terminal Transactivation Domains of p53 for p300 Domains and Mdm2. *Oncogene* **2009**, *28* (20), 2112–2118.
- Thakker, S.; Purushothaman, P.; Gupta, N.; Challa, S.; Cai, Q.; Verma, S. C. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Latency-Associated Nuclear Antigen Inhibits Major Histocompatibility Complex Class II Expression By Disrupting Enhanceosome Assembly through Binding with the Regulatory Factor X Complex. *Journal of Virology* **2015**, *89* (10), 5536–5556.
- Thome, M.; Schneider, P.; Hofmann, K.; Fickenscher, H.; Meinl, E.; Neipel, F.; Mattmann, C.; Burns, K.; Bodmer, J.-L.; Schröter, M.; et al. Viral FLICE-Inhibitory Proteins (FLIPs) Prevent Apoptosis Induced by Death Receptors. *Nature* **1997**, *386* (6624), 517–521.
- Togi, S.; Nakasuji, M.; Muromoto, R.; Ikeda, O.; Okabe, K.; Kitai, Y.; Kon, S.; Oritani, K.; Matsuda, T. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded LANA Associates with Glucocorticoid Receptor and Enhances Its Transcriptional Activities. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2015**, *463* (3), 395–400.
- Toledo, F.; Wahl, G. M. Regulating The p53 Pathway: in Vitro Hypotheses, in Vivo Veritas. *Nature Reviews Cancer* **2006**, *6* (12), 909–923.
- Toth, Z.; Brulois, K.; Lee, H.-R.; Izumiya, Y.; Tepper, C.; Kung, H.-J.; Jung, J. U. Biphasic Euchromatin-To-Heterochromatin Transition on the KSHV Genome Following De Novo Infection. *PLoS Pathogens* **2013**, *9* (12) e1003813.
- Tzivion, G.; Dobson, M.; Ramakrishnan, G. FoxO Transcription Factors; Regulation by AKT and 14-3-3 Proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2011**, *1813* (11), 1938–1945.
- Umbach, J. L.; Cullen, B. R. In-Depth Analysis Of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus MicroRNA Expression Provides Insights into the Mammalian MicroRNA-Processing Machinery. *Journal of Virology* **2009**, *84* (2), 695–703.
- Vogelstein, B.; Lane, D.; Levine, A. J. Surfing the p53 network. *Nature* **2000**, *408* (6810), 307–310.
- Voorhoeve, P. M.; Agami, R. Knockdown Stands Up. *Trends in Biotechnology* **2003**, *21* (1), 2–4.
- Wang, H.-W.; Trotter, M. W. B.; Lagos, D.; Bourboulia, D.; Henderson, S.; Mäkinen, T.; Elliman, S.; Flanagan, A. M.; Alitalo, K.; Boshoff, C. Kaposi Sarcoma Herpesvirus-Induced Cellular Reprogramming Contributes to the Lymphatic Endothelial Gene Expression in Kaposi Sarcoma. *Nature Genetics* **2004**, *36* (7), 687–693.
- Wang, J.; Wiltshire, T.; Wang, Y.; Mikell, C.; Burks, J.; Cunningham, C.; Laar, E. S. V.; Waters, S. J.; Reed, E.; Wang, W. ATM-Dependent CHK2 Activation Induced by Anticancer Agent, Irofulven. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279* (38), 39584–39592.
- Wang, S. E.; Wu, F. Y.; Yu, Y.; Hayward, G. S. CCAAT/Enhancer-Binding Protein- Is Induced During the Early Stages of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (KSHV) Lytic Cycle Reactivation and Together with the KSHV Replication and Transcription Activator (RTA) Cooperatively Stimulates the Viral RTA, MTA, and PAN Promoters. *Journal of Virology* **2003**, *77* (17), 9590–9612.



- Warnock, L. J.; Knox, A. A.; Mee, T. R.; Raines, S. A.; Milner, J. Influence Of Tetramerisation on Site-Specific Post-Translational Modifications of p53: Comparison of Human and Murine p53 Tumour Suppressor Protein. *Cancer Biology and Therapy* **2008**, *7* (9), 1481–1489.
- Wen, K. W.; Damania, B. Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus (KSHV): Molecular Biology and Oncogenesis. *Cancer Letters* **2010**, *289* (2), 140–150.
- Wies, E.; Hahn, A. S.; Schmidt, K.; Viebahn, C.; Rohland, N.; Lux, A.; Schellhorn, T.; Holzer, A.; Jung, J. U.; Neipel, F. The Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded VIRF-3 Inhibits Cellular IRF-5. *Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284* (13), 8525–8538.
- Wies, E.; Mori, Y.; Hahn, A.; Kremmer, E.; Sturzl, M.; Fleckenstein, B.; Neipel, F. The Viral Interferon-Regulatory Factor-3 Is Required for the Survival of KSHV-Infected Primary Effusion Lymphoma Cells. *Blood* **2008**, *111* (1), 320–327.
- Wu, X.; Bayle, J. H.; Olson, D.; Levine, A. J. The p53-Mdm-2 Autoregulatory Feedback Loop. *Genes and Development* **1993**, *7* (7a), 1126–1132.
- Xi, X.; Persson, L. M.; O'brien, M. W.; Mohr, I.; Wilson, A. C. Cooperation Between Viral Interferon Regulatory Factor 4 and RTA To Activate a Subset of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Lytic Promoters. *Journal of Virology* **2012**, *86* (2), 1021–1033.
- Xiong, Y.; Hannon, G.J.; Zhang, H.; Casso, D.; Kobayashi, R.; Beach, D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* **1993**, *366* (6456), 701–704.
- Xu, Y. Regulation Of p53 Responses by Post-Translational Modifications. *Cell Death and Differentiation* **2003**, *10* (4), 400–403.
- Yi, F.; Saha, A.; Murakami, M.; Kumar, P.; Knight, J. S.; Cai, Q.; Choudhuri, T.; Robertson, E. S. Epstein–Barr Virus Nuclear Antigen 3C Targets p53 and Modulates Its Transcriptional and Apoptotic Activities. *Virology* **2009**, *388* (2), 236–247.
- Yip, K. W.; Cuddy, M.; Pinilla, C.; Giulianotti, M.; Heynen-Genel, S.; Matsuzawa, S.-I.; Reed, J. C. A High-Content Screening (HCS) Assay For the Identification of Chemical Inducers of PML Oncogenic Domains (PODs). *Journal of Biomolecular Screening* **2011**, *16* (2), 251–258.
- Zaichick, S. V.; Bohannon, K. P.; Hughes, A.; Sollars, P. J.; Pickard, G. E.; Smith, G. A. The Herpesvirus VP1/2 Protein Is An Effector of Dynein-Mediated Capsid Transport and Neuroinvasion. *Cell Host and Microbe* **2013**, *13* (2), 193–203.
- Zhang, L.; Pagano, J. S. Review: Structure And Function of IRF-7. *Journal of Interferon and Cytokine Research* **2002**, *22* (1), 95–101.
- Zhao, J. Sumoylation Regulates Diverse Biological Processes. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2007**, *64* (23), 3017–3033.
- Zimring, J.C.; Goodbourn, S.; Offermann, M.K. Human herpesvirus 8 encodes an interferon regulatory factor (IRF) homolog that represses IRF-1-mediated transcription. *Journal of Virology* **1998**, *72* (1), 701–707.
- Zuo, J.; Hislop, A. D.; Leung, C. S.; Sabbah, S.; Rowe, M. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded Viral IRF3 Modulates Major Histocompatibility Complex Class II (MHC-II) Antigen Presentation Through MHC-II Transactivator-Dependent and -Independent Mechanisms: Implications for Oncogenesis. *Journal of Virology* **2013**, *87* (10), 5340–5350.

## 8. Přílohy

Příloha č. 1:

**Baresova P**, Musilova J, Pitha PM, Lubyova B, *p53 tumor suppressor protein stability and transcriptional activity is targeted by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded vIRF-3*, Mol Cell Biol. **2014**, Feb;34(3):386-99

Příloha č. 2:

**Baresova P**, Pitha PM, Lubyova B., *Distinct Roles of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded Viral Interferon Regulatory Factors in Inflammatory Response and Cancer.*, Review, J Virol. **2013**, Sep;87(17):9398-410

Příloha č. 3:

**Baresova P**, Pitha PM, Lubyova B., *Kaposi sarcoma-associated herpesvirus vIRF-3 protein binds to F-box of Skp2 protein and acts as a regulator of c-Myc protein function and stability.* J Biol Chem. **2012**, May 11;287(20):16199-208

